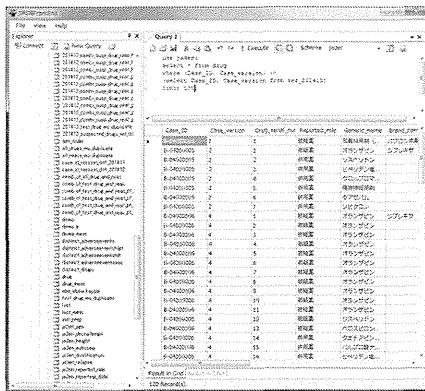


a) データベース作成, 管理ソフトウェア



b) Webベース, 有害事象解析システム

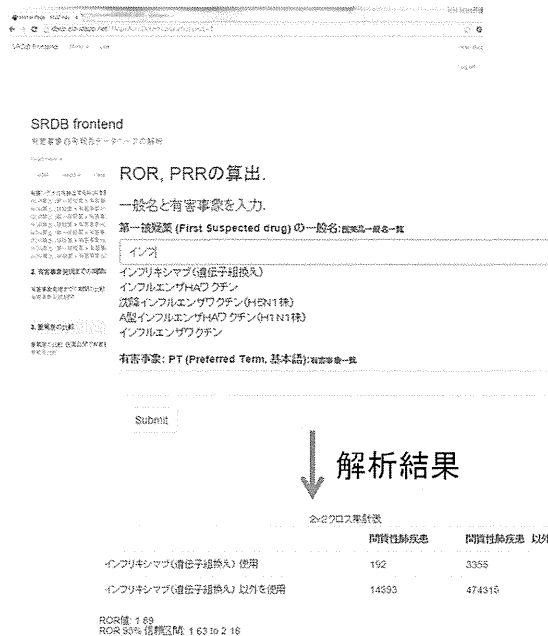


図 1-60. 作成した JADER リレーショナルデータベース作成, 管理ソフトウェア (a) と web ベース有害事象解析システム. a) PMDA で公開されている CSV ファイルから RDB を作成し, 着目すべき任意のレポートを抽出できる. b) 様々な解析を web ベースで行うことができる.

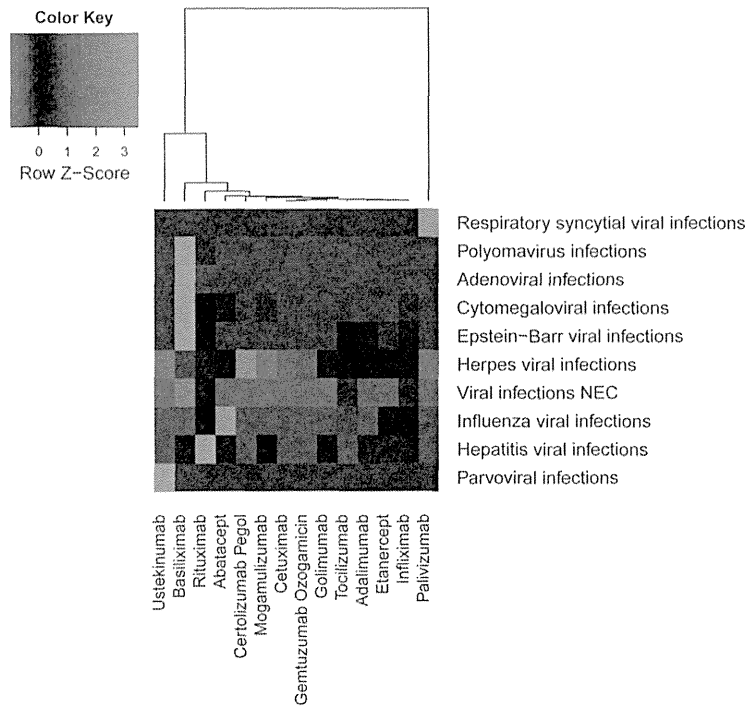


図 1-61. ヒートマップを用いた着目すべき薬剤の可視化. 有害事象ごとに各医薬品の ROR を Z スコアで正規化している. 赤に近いほど Z スコアが高く, 優先的に考察すべき薬剤であることを示す.

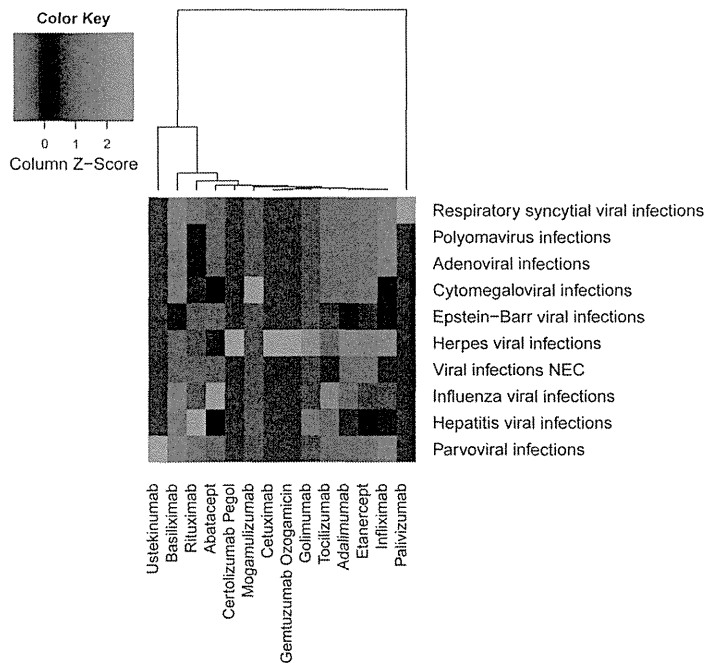


図 1-62. ヒートマップを用いた着目すべき有害事象の可視化. 有害事象ごとに各医薬品の ROR を Z スコアで正規化している. 赤に近いほど Z スコアが高く, 優先的に考察すべき有害事象であることを示す.

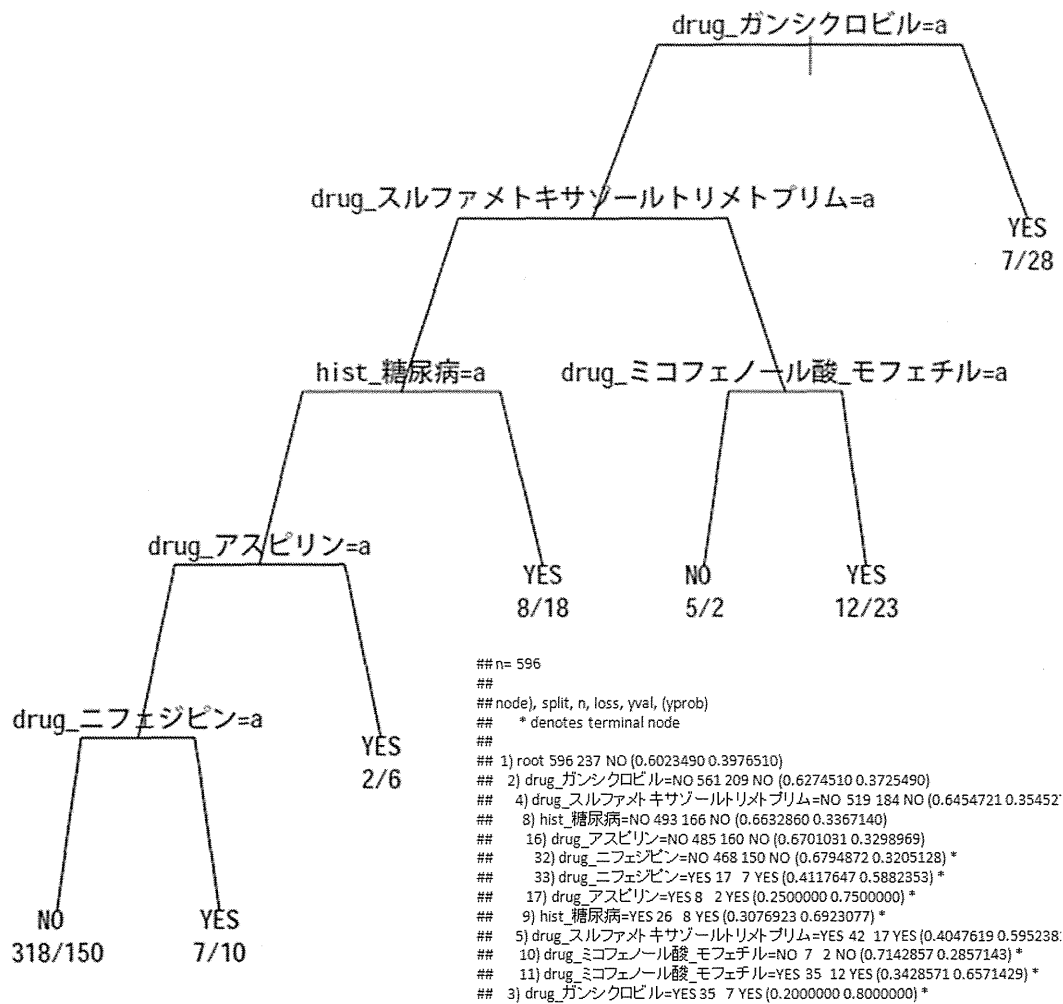


図 1-63. 決定木を用いたバシリキシマブ使用時の、サイトメガロウイルス感染リスク因子の推定.

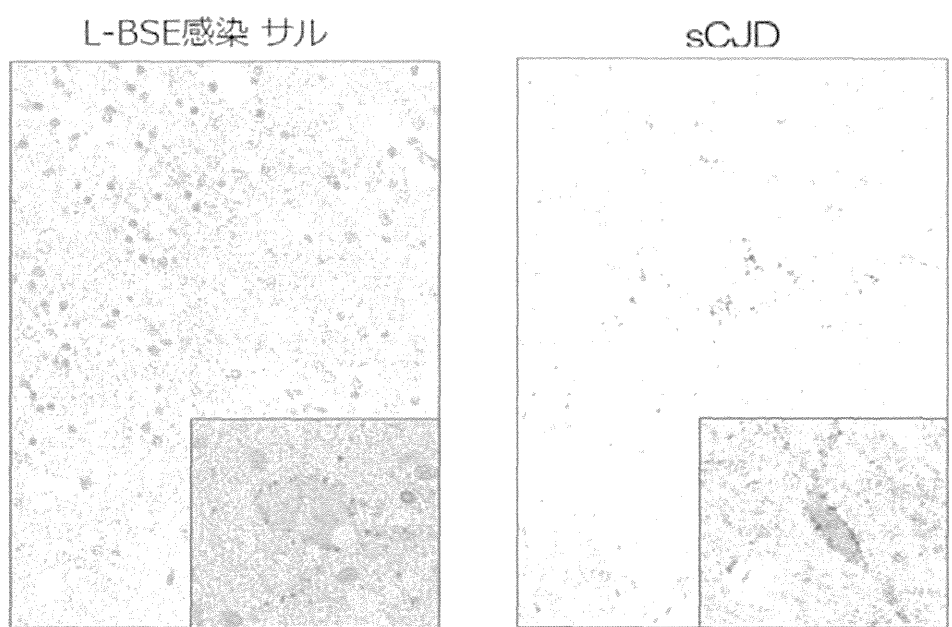


図 2-1

前処理法の改良による染色性の向上

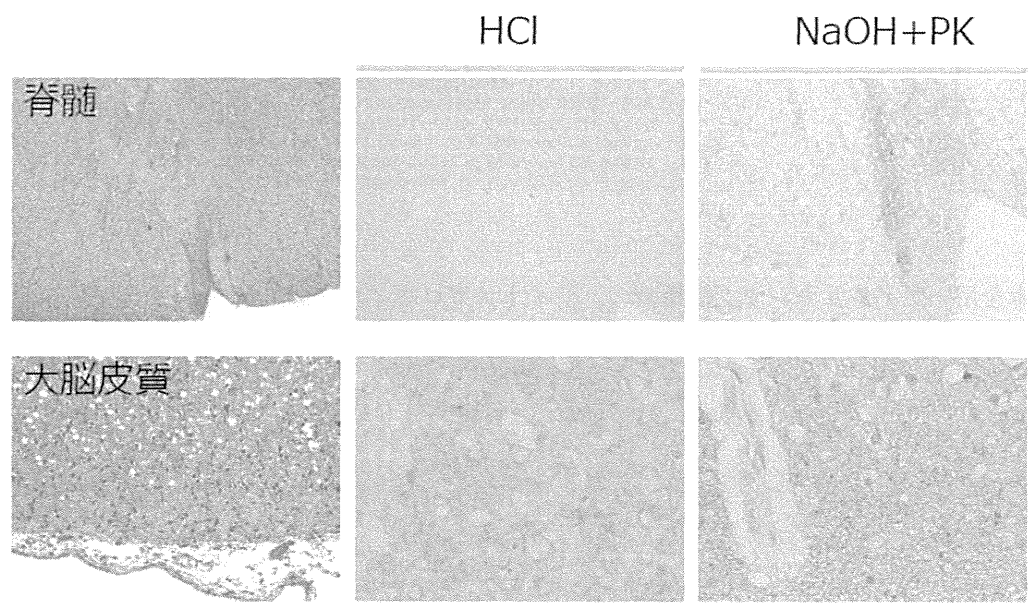
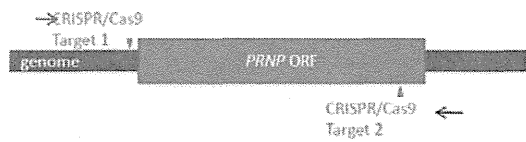
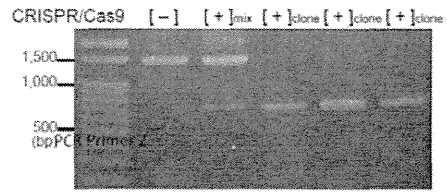


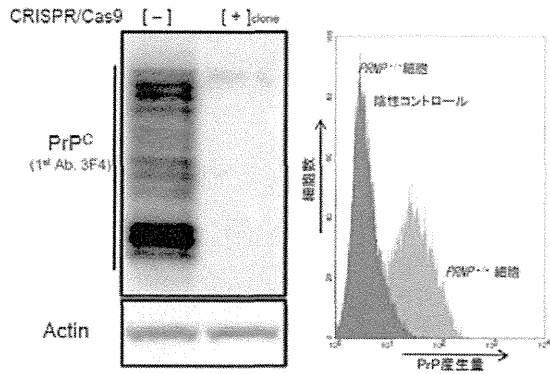
図 2-2



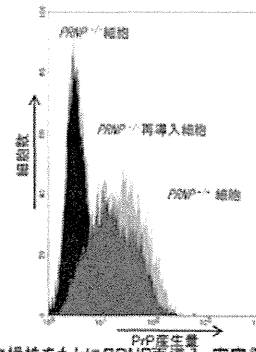
・2箇所 (PRNP ORFの上流およびPRNP ORF C末側に位置する部位)のCRISPR/Cas9ターゲット配列を設定した



・PCRにおいてdeletion typeのバンドのみが確認されるクローンが得られた



・FACSおよびWB解析の結果からも、PRNP欠損株が樹立できたと考えられた



PRNP欠損株をもとにPRNP再導入・安定発現細胞を得ることも可能であった

図 2-3

図 3-1  
工程評価試験フロー

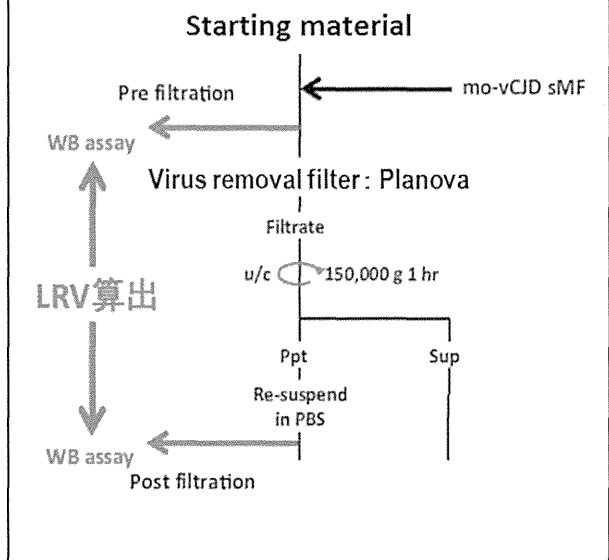


表 3-1  
Prion removal using 15nm virus reduction filter

	mo-vCJD (sMF)	263K (sMF)
Pre filtration	2.5	3.6
Post filtration	<-0.3	<0.8
LRV	≥2.8	≥2.8

sMF: super-sonicated microsomal fraction  
LRV: Log reduction value

図 3-2  
WB 結果

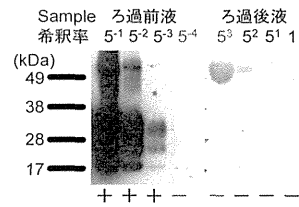


表 3-2  
膜孔径によるろ過

Filter	35 nm	19 nm	15 nm	
Preparation	Fibrinogen		Antithrombin	
Titer	Before filtration	2.7	2.6/2.6	2.5
	Filtrate	1.5	<-0.9/<-0.9	<-0.3
LRV	1.2	≥3.5	≥2.8	

表 3-3  
電荷による吸着除去

Filter	Qyu Speed D		
Preparation	PBS	Fibrinogen	
Titer	Before filtration	4.6	3.9
	Filtrate	1.1	<-0.3
LRV	3.5	≥4.2	

図 3-3  
感染 3 週後の細胞中のプリオン (WB 結果)

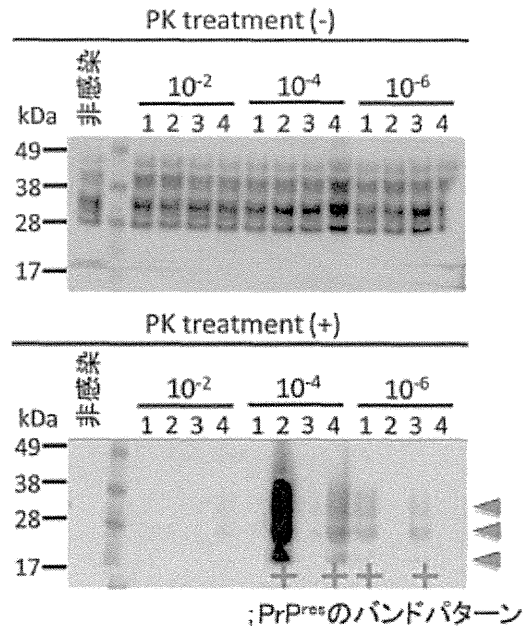


図 3-4 ろ過実験及び接種材料調製概略

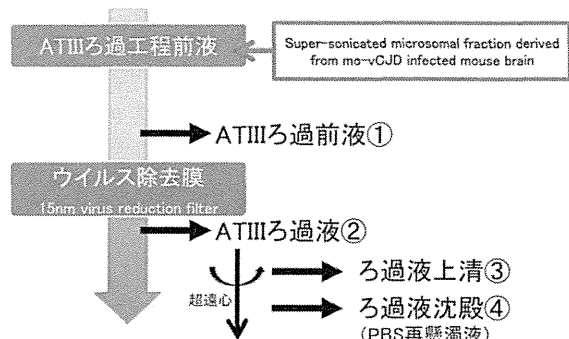
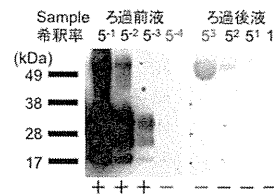


表 3-4・図 3-5 15nm フィルターろ過結果 (WB)

mo-vCJD (sMF)	
ろ過前	2.5
ろ過後	< -0.3
LRV	≥ 2.8

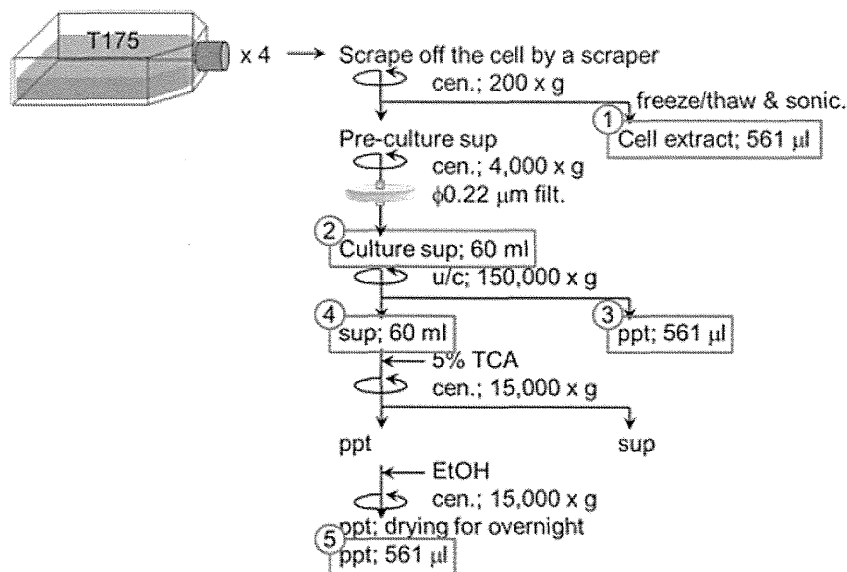


\* 数値表記はWestren Blot法によるタイターの  $\log_{10}$

\* sMF; super-sonicated microsomal fraction

\* LRV; Log reduction value

図 3-6 vCJD 感染細胞由来プリオン材料調製方法フロー



mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 から、細胞抽出画分①、培養液の超遠心沈殿画分③、超遠心上清画分の TCA 沈殿⑤ (プリオン材料) の調製方法. それぞれの画分は 1%脳乳剤 1 mL に相当する細胞数である  $5 \times 10^7$  cell/ml (検体量として 561 $\mu$ l) に調製した.

表 3-5 ATIII 製剤 15nm フィルターろ過サンプルのマウス接種試験結果

group No.	Inoculum		TI or Endpoint dpi	BW (g)		WB		HE		IHC	
	dilution			Avr.	Reduc. rate	positive	rate(%)	positive	rate(%)	positive	rate(%)
#1	10 <sup>-1</sup>		177	21.1	26.2%	6/6	100	6/6	100	6/6	100
#2	10 <sup>-2</sup>		189-194	19.1	33.2%	6/6	100	6/6	100	6/6	100
#3	ろ過直前液	10 <sup>-3</sup>	203	22.3	22.2%	4/6	67	6/6	100	6/6	100
#4		10 <sup>-4</sup>	203	22.2	22.4%	3/6	50	2/6	33	4/6	67
#5		10 <sup>-5</sup>	177	18.6	34.8%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#6	X1		206	27.4	4.1%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#7	ろ過液	10 <sup>-1</sup>	206	25.8	10.0%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#8		10 <sup>-2</sup>	206	22.7	20.6%	0/6	0	0/5	0	0/6	0
#9	ろ過液上清	X2	204	24.5	14.2%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#10	ろ過液洗殿	100倍濃縮	151-176	19.5	31.7%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
CN			203	28.6		0/6	0	0/6	0	0/6	0

表 3-6 WB 法と BA 法判定による感染価の算出とその比較

mo-vCJD (sMF)		
	WB	BA
Pre filtration	2.5	5.2
Post filtration	<-0.3	<1.0 (<-1.0)
LRV	≥2.8	≥4.2 (≥6.2)

Titers are indicated by log<sub>10</sub>sMF: super-sonicated microsomal fraction, LRV: Log reduction value, WB: Western blotting, BA: Bio assay (Infection titer was determined by detection PrP<sup>res</sup> in brain) ( ): concentrated sample

図 3-7 プリオン感染マウス脳の HE 染色像および免疫染色像

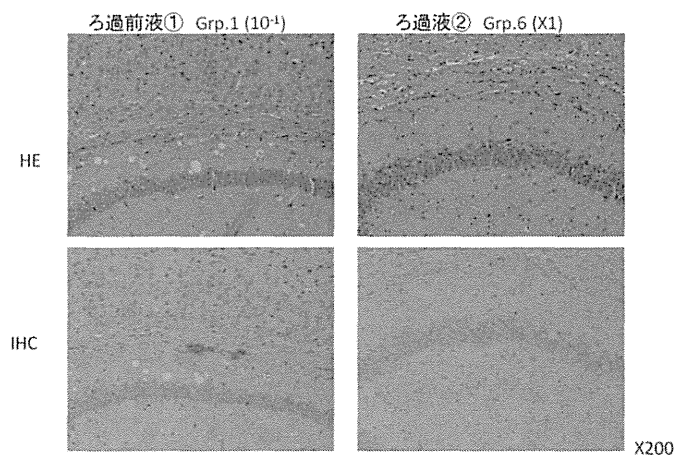




表 3-7 mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 より調製した細胞抽出画分 (cell extract), 培養液の超遠心沈殿画分 (u/c-p), 超遠心上清画分の TCA 沈殿 (u/c-s-TCA) を感染させた動物の所見

	動物番号	観察期間 (dpi)	HE 染色 所見	免疫染色所見	脳検体 WB PrP <sup>Res</sup> 検出	
Cell extract	1-1	202	+	+	+	
	1-2	202	+	+	+	
	1-3	175	+	+	+	
	1-4	181	+	+	+	
	1-5	202	+	+	+	
	1-6	181	+	+	+	
	1-7	195	+	+	+	
	1-8	195	+	+	+	
	1-9					
			180	+	+	+
	3-11	202	-	-	-	
u/c-p	1-10	195	+	+	+	
	2-1	202	+	+	+	
	2-2	202	+	+	+	
	2-3	202	+	+	+	
	2-4	202	+	+	+	
	2-5	202	+	+	+	
	2-6	202	+	+	+	
	2-7	202	+	+	+	
	2-8	202	+	+	+	
	2-9	202	+	+	+	
u/c-s-TCA	10	202	+	+	+	
	3-1	202	-	-	-	
	3-2	202	-	-	-	
	3-3	124	-	-	-	
	3-4	202	-	-	-	
	3-5	202	-	-	-	
	3-6	202	-	-	-	
	3-7	124	-	-	-	
	3-8	202	-	-	-	
	3-9	153	-	-	-	
3-10	153	-	-	-		

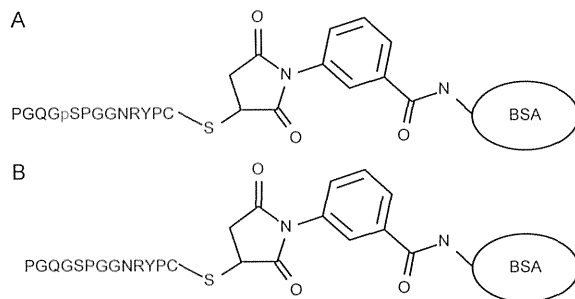


Fig. 3-8. Schematic diagram of antigens.

Table 3-8. 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
		固相抗原		
		リン酸化 プリオン ペプチド	プリオン ペプチド	
pSP240	$\kappa, \gamma 2b$	2,941	2,000	1.5
pSP279	$\kappa, \gamma 2b$	2,500	294	8.5
pSP289	$\kappa, \gamma 2b$	1,111	233	4.8

\*IgG 200 $\mu$ g/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 ( $\kappa, \gamma 2b$ )だった。

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。

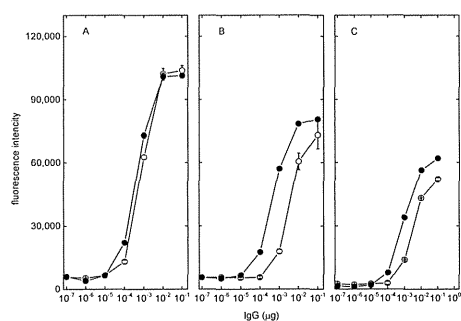
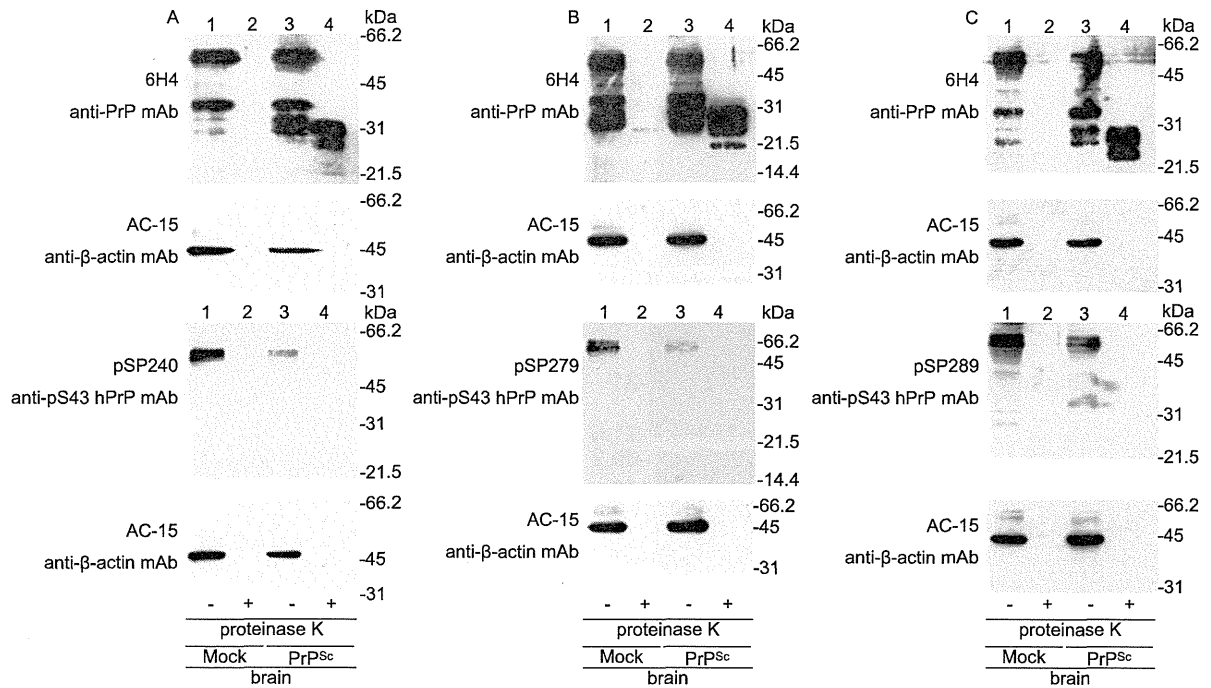
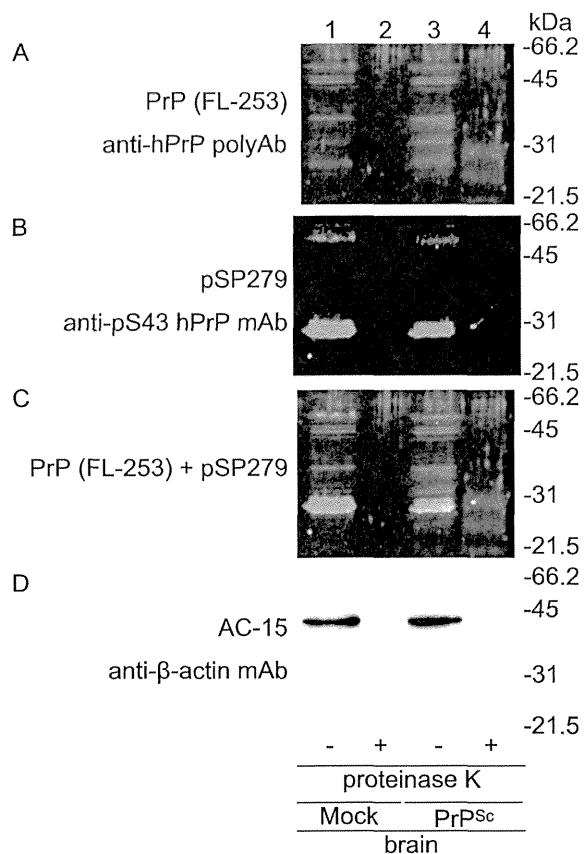


Fig. 3-9. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.



**Fig. 3-10. Immunoblot analysis of mouse PrP<sup>Sc</sup>.** The mock or PrP<sup>Sc</sup> 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).

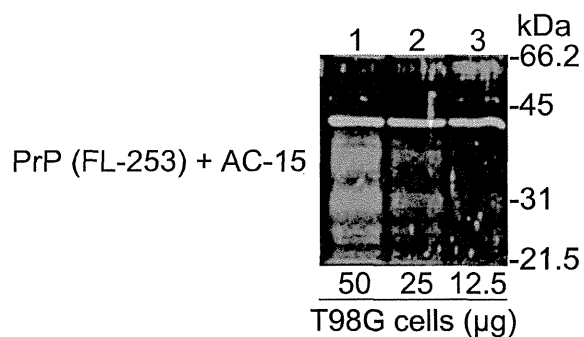


**Fig. 3-11. Immunoblot analysis of mouse PrP<sup>Sc</sup>.**

The mock or PrP<sup>Sc</sup> inoculated mouse brain were prepared. 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) 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 anti-hPrP (FL-253; A and C), anti-pS43 hPrP mAb (pSP279; B and C) or anti-β-actin (AC-15; D).

Table 3-9. pS43-PrP in mouse brain homogenates

brain	intensity		normalized
	PrP	β-actin	PrP/β-actin
Mock	0.311	0.648	0.480
PrP <sup>Sc</sup>	0.207	0.643	0.322



**Fig. 3-12. Immunoblot analysis of human PrP<sup>C</sup>.**

Human glioblastoma cell line T98G whole-cell lysates were subjected to Immunoblot with PrP (FL-252) (orange) and AC-15 (green) antibodies.

表 3-10. In vitro 細胞培養による PrP<sup>sc</sup> 増幅系

細胞名	細胞を分離した組織	細胞種	プリオン株
<b>1. 神経/脳由来細胞株</b>			
N2a	neuroblastoma cell line*	mouse	Chandler, RML, 139A, 22L, C506, Fukuoka-1, FU CJD
GT1	hypothalamic cell line	mouse	Chandler, RML, 139A, 22L, kCJD, FU CJD, M1000
SN56	cholinergic septal cell line	mouse	Chandler, ME7, 22L
HpL3-4	hippocampal PrP-deficient cell line, upon ectopic expression of moPrP*	mouse	22L
CF10	brain derived PrP-deficient cell line, upon ectopic expression of moPrP	mouse	22L
SMB	prion-infected brain cell	mouse	Chandler, 139A, 22F, 79A
CAD	catecholaminergic cell line	mouse	RML, 22L, 22F, 79A, 139A, ME7
MG20	microglial cell line overexpressing PrPC	tg20 mouse	Chandler, ME7, Obihiro, mouse-adapted BSE
PC12	pheochromocytoma cell line	rat	139A, ME7
HaB	brain-derived cell line	hamster	Sc237
SH-SY5Y	neuroblastoma cell line	human	sCJD brain material
MDB	primary brain cells, SV40 transformed	mule deer	CWD
<b>2. 神経/脳由来初代分離細胞</b>			
CGN	cerebellar granule neurons overexpressing ovine PrPC	tgov mouse	mo 127S
CAS	cerebellar astrocytes overexpressing ovine PrPC	tgov mouse	mo 127S
NSC	neural stem cells	mouse	22L, RML
<b>3. 非神経細胞株</b>			
G2C12	skeletal myoblast cell line	mouse	22L
L fibroblasts	fibroblast cell line	mouse	ME7, Chandler
L929	fibroblast cell line	mouse	22L, RML, ME7
NIH/3T3	fibroblast cell line	mouse	22L
MSC-80	Schwann cell line	mouse	Chandler
MovS	Schwann cell-like from dorsal root ganglia	tgov mouse	PG127, SSBP/1, scrapie field isolates
moRK13	epithelial cell line expressing mouse PrPC	rabbit	Fukuoka-1, 22L, Chandler, M1000, mo sCJD
voRK13	epithelial cell line expressing vole PrPC	rabbit	vo BSE

ovRK13/ RoV9	epithelial cell line expressing ovine PrPC	rabbit	PG127, SSBP/1, field isolates	LA404, scrapie
eIkRK13	epithelial cell line expressing elk PrPC	rabbit	CWD	
<b>4. 非神経由来初代細胞</b>				
BM-derived MSC	bone marrow derived mesenchymal stem cell	mouse	Fukuoka-1	
BM-derived MSC-like	bone marrow derived mesenchymal stem cell like	mouse	Fukuoka-1	

表 3-11. ナノフィルターを用いたプリオンタンパク質除去能の評価

Spike	感染株の調製	適用フィルター	残存感染価	低減率	アッセイ法	著者
TSE 株 スクレイピーME7	脳乳剤/-Detergent	35nm	有	4.9	エンドポイント	Tateishi (2001)
		15nm	無	>5.8		
	脳乳剤/0.5%ザルコシル	35nm	有	1.6		
		15nm	無	>4.2		
		10nm	無	>3.8		
263K スクレイピー	脳乳剤+超音波処理	220+40+25nm	有	2	エンドポイント	Pocchiari(1988)
	脳乳剤 + 超音波処理 +detergent	15nm	有	NA	バイオアッセイ	Rohwer UP
	マイクロソーム	75nm	有	3.2	エンドポイント	Flan (2007)
		15nm	有	4.8		
	超音波マイクロソーム	15nm	有	NA	バイオアッセイ	Yunoki(2008)
	超音波マイクロソーム+リゾレシチン	15nm	有	4.7/4.0		Yunoki(2010)
	清澄化脳ホモジナイズ	100+30+20nm	無	>5.4	エンドポイント	Diez (2010)
127S スクレイピー	脳乳剤	15nm	無	>4.6	細胞培養アッセイ	You (2010)
BSE-6PB1	マイクロソーム	15nm	有	5.3	エンドポイント	Flan (2007)
GSS-KFu	脳乳剤/-Detergent	75nm	有	0.7	バイオアッセイ	Tateishi (2001)
		60nm	有	1.1		
		50nm	無	NA		
		40nm	有	2		
		35nm	無	NA		
		75+35nm	無	NA		
		60+35nm	無	NA		
	60+60nm	有	2.6			
	脳乳剤/+ザルコシル	40nm	有	-0.9		
	脳乳剤/-Detergent	10nm	無	NA	バイオアッセイ	Tateishi (2001)
脳乳剤/+ザルコシル	10nm	有	2			

表 3-12. スパイク検体の作製法によってプリオンクリアランスが大きく異なる

フィルター	低速遠心上清		スーパー超速遠心上清	
	means+/-SEM	LRF	means+/-SEM	LRF
100nm	6.6 +/- 0	2.3	5.0 +/- 0.1	0.9
75nm	6.4 +/- 0.1	2.5	4.5 +/- 0.2	1.4
35nm	6.3 +/- 0.2	2.6	4.5 +/- 0.3	1.4
ミリポア NFP	4.9 +/- 0.4	4	4.1 +/- 0.3	1.8

アサヒ化成 20nm	4.8+/- 0.5	4.1	4.2+/- 0.3	1.7
------------	------------	-----	------------	-----

Pall DV20

1回目	4.7+/- 0.3	4.2	4.2+/- 0.4	1.7
-----	------------	-----	------------	-----

2回目	4.2+/- 0.3	4.7	4.0+/- 0.2	1.9
-----	------------	-----	------------	-----

アサヒ化成 15nm

1回目	4.5+/- 0.4	4.4	3.8+/- 0.1	2.1
-----	------------	-----	------------	-----

2回目	3.6+/- 0.1	5.3	3.6	2.3
-----	------------	-----	-----	-----



表 3-13. A. PMCA 法による異常プリオンの検出系としてヒツジ ARQ プリオンに有用性 1)

異常プリオンの由来種	マウス	ヒト M129	ウシ	ヒツジ VRQ	ヒツジ ARQ
BSE 感染ブタ	+/-	+	+	++++	++++
BSE 感染ヒツジ	+	+/-	+/-	++++	++++
BSE 感染ウシ	+	-	++	++++	++++
vCJD 感染霊長類	+	-	+	+++	+++
vCJD 感染ヒト	+/-	++	+	++++	++++
対照	-	-	-	-	-

- Q171 遺伝子型ヒツジプリオンが PMCA 法による多種の異常プリオン検出に有効との結論
- 但し, Q171 遺伝子型であっても 154 や 158 番目の遺伝子型の違いによって抵抗性になる可能性

表 3-13. B

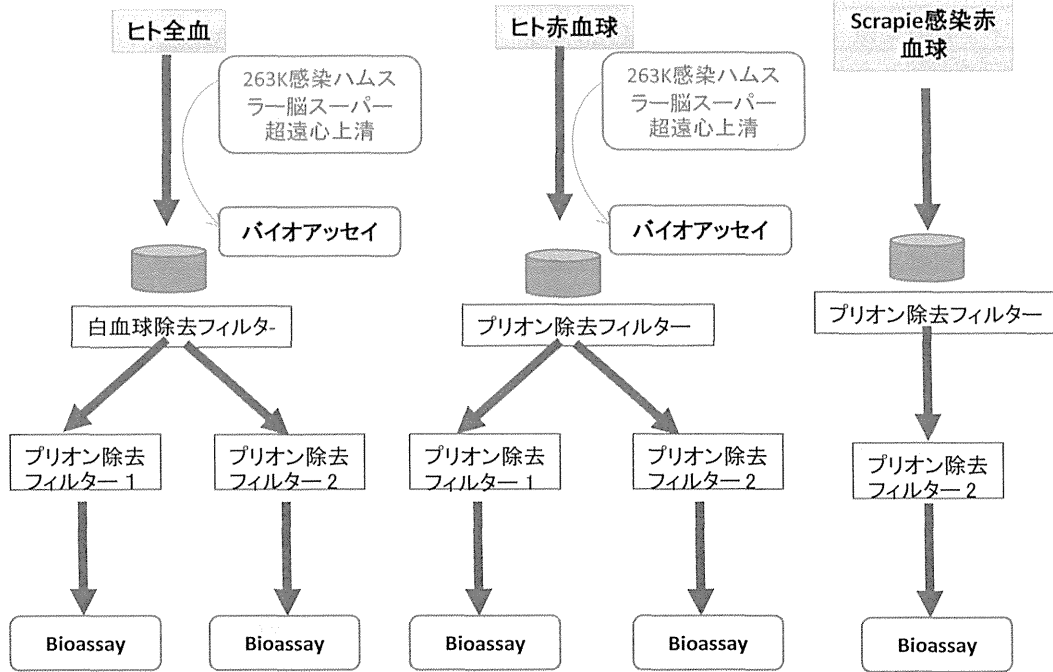
136	154	158	171	Successibility
V	R		Q	+
A	R		Q	+
A	H		Q	-
A	R		R	-
A	R	P	Q	+
A	R	L	Q	-

1) Lacroux, C. et al.: PLoS Pathog. 10, e1004202 (2014)

2) Razaeei, H. et al.: J. Mol. Biol. 322, 799 (2002)

3) Goldmann, W. et al.: J. Gen. Virol. 87, 3741 (2006)

図 3-13. ヒト血液に感染させた異常プリオンのフィルターでの除去能評価の最適化



Cardone, F. et al. (2014) Transfusion 54, 990-995

図 3-14. インビトロ細胞培養系による異常プリオンの検出系

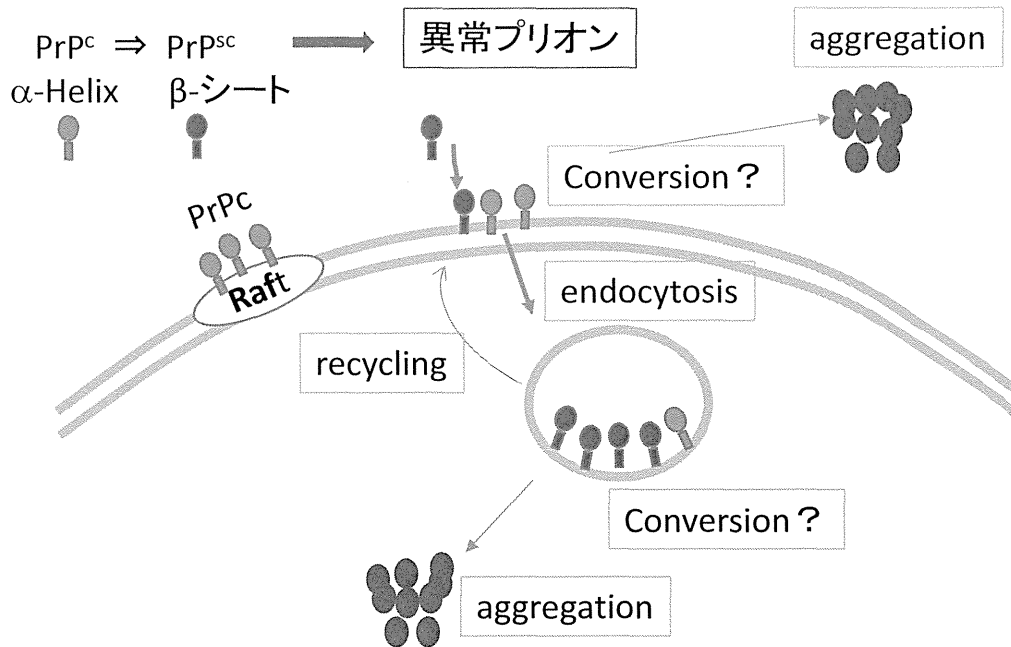


Table 4-1 バリデーション用マイコプラズマ参照菌株の濃度とゲノムコピー数

Strain	Origin	Host	Post preservation titer (CFU/mL)		Genome copies/CFU ratio
			mean	SE	
<i>Acholeplasma laidlawii</i> NBRC 14400	Sewage	Bovine	2.87E+08	6.67E+06	18.92
<i>Mycoplasma fermentans</i> NBRC14854	Ulcerative balanitis	Human	7.97E+06	2.79E+06	67.38
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> NBRC14858	Nasal cavity of pig	Swine	2.19E+08	3.68E+07	10.23
<i>Mycoplasma orale</i> NBRC14477	Human-orpharynx of child	Human	1.18E+08	1.02E+07	22.20
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> NBRC14401	Human-atypical pneumoniae	Human	2.42E+07	6.86E+06	57.85
<i>Mycoplasma salivarium</i> NBRC14478	Saliva	Human	6.93E+07	4.11E+07	30.30
<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC23838	Mouse brain experimentally infected with scrapies	Bovine, Caprine	5.30E+08	2.29E+07	8.11

Table 4-2 EP 準拠市販マイコプラズマ検出キットの特徴

キット名	MycotoOL (PCR)	MycotoOL (real-time PCR)	Mycoseq	CytoCheck	MilliProbe	
会社	Roche Diagnostics		Life Technologies	Greiner bio-one	Merck Millipore	
特化	CHO		-	-	-	
抽出	推奨検体量	1 mL	100 $\mu$ L-10 mL	1mL	20mLまで可能	
	細胞濃度/細胞数上限	5 $\times$ 10 <sup>6</sup> cells/mL	1 $\times$ 10 <sup>6</sup> cells (1 $\times$ 10 <sup>6</sup> ~ 2 $\times$ 10 <sup>8</sup> cellsでは上清を使用)	上清	細胞と分離後抽出	
核酸増幅	ターゲット	16S rRNA (DNA)	16S rRNA (DNA)	非公開(DNA)	16S-23S rRNA spacer (DNA)	16S rRNA
	プライマー・プローブ配列	公開	非公開	非公開	非公開	非公開
	PCR原理	Touch down PCR	Real-time Touch down PCR	Real-time PCR	PCR	TMA法
	検出	PAGE	プローブ法	SYBR Green法	DNA-chip	蛍光プローブ
公表検出下限	< 10CFU/mL	< 10 CFU/mL	< 10 CFU/mL (10mL使用時)	< 10 CFU/mL	< 10 CFU/mL	

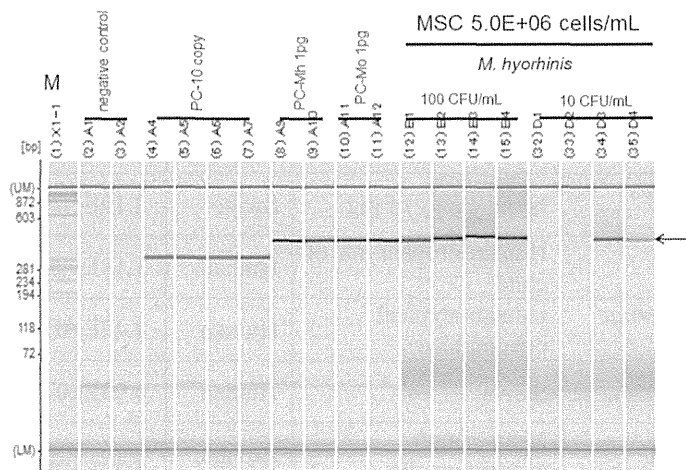


Fig.4-1 MSC ( $5 \times 10^6$  cells/mL)にスパイクした *M.hyorhinis* の MycoTOOL PCR による検出

Table 4-3 MycoTOOL PCR による *M. hyorhinis* の検出：細胞の種類と細胞濃度の影響

<i>M. hyorhinis</i>	Sermon sperm DNA	cells/mL							
		CHO	MSC						
		$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	0
100 CFU/mL	-	2/2*	4/4	8/8	4/4	2/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	nd	nd	8/8	8/8	8/8	4/4
10 CFU/mL	-	6/6	2/4	7/8	2/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	4/4	4/4	8/8	7/8	6/8	4/4

\*: 検出数/試験数； nd: not determined