

厚生省科学研究費

新興・再興感染症研究事業

プリオン病の高感度診断技術の開発

平成10年度 研究報告書

平成11年3月

主任研究者 品川 森一

帯広畜産大学畜獣医公衆衛生学

目 次

1. プリオン病の高感度診断技術の開発
主任研究者：品川 森一（帯広畜産大学獣医公衆衛生学）
2. スクレイピー材料を用いた高感度検出系の開発
主任研究者：品川 森一（帯広畜産大学獣医公衆衛生学）
3. 抗プリオン抗体による異常プリオンの高感度検出系の開発及び
抗14-3-3抗体及び脊髄を用いた診断系の開発
分担研究者：高橋 秀宗（国立感染症研究所感染病理部）
4. スクレイピー材料を用いた高感度検出系の開発
分担研究者：神山 恒夫（国立感染症研究所獣医科学部）
5. プリオン病の高感度診断技術の開発
分担研究者：澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所機能生化学）
6. プリオン蛋白質の高感度検出系の開発
分担研究者：岡田 義昭（国立感染症研究所）
7. プリオン病のバイオアッセイに関する研究
分担研究者：北本 哲之（東北大学大学院医学研究科）
8. 白オリックスプリオン遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの
作成及びノックアウトマウスの交配
分担研究者：小野寺 節（東京大学農学部）

総括研究報告書

プリオン病の高感度診断技術の開発

主任研究者 帯広畜産大学獣医公衆衛生学 教授 品川森一

研究要旨

PrPの合成ペプチドに対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が10種以上作成され、異常プリオン蛋白だけを免疫沈降で認識する抗体も存在した。PrPコアのN末端領域ペプチドに対する抗体は一般に高力価であった。次いでC末端領域に対する抗体が使用に耐えるものであった。コラーゲンおよびゼラチンを対象とした試料調整法を確立した。また抗体結合磁気ビーズ法がPrPScの補足のために導入できた。この試料を用いてELISA法も可能となった。ヒト型のトランスジェニック・マウスとプリオン蛋白のノックアウトマウスを交配し、完全にトランスジェニックだけが発現するマウスはヒト・プリオンに対して高感受性であった。ヒツジ型トランスジェニック・マウスの羊スクレイピープリオンに対する感受性を感染試験を行い観察中である。ヒツジ型のトランスジェニック・マウスをプリオン蛋白のノックアウトマウスと交配し、完全ヒツジ型の作製中である。シロオリックストランスジェニックマウスとプリオン蛋白のノックアウトマウスと交配して完全シロオリックス型を作成している。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

品川 森一・帯広畜産大学畜産学部・教授

高橋 秀宗・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

神山 恒夫・国立感染症研究所獣医科学部・室長

澤田 純一・国立医薬品食品衛生研究所・部長

岡田 義昭・国立感染症研究所細菌血清製剤部・室長

北本 哲之・東北大学医学部・教授

小野寺 節・東京大学農学部・教授

A. 研究目的

汚染脳硬膜移植によるクロイツフェルト・ヤコブ病の発生、牛屑肉を介した牛海綿状脳症の人への伝播等、伝達性海綿状脳症の感染による発生が現実のものとなっていることから、該疾病の感染因子をバイオアッセイにより高感度にしかも短時間で検出できる実験動物の開発と、その構成蛋白であるPrPScを高感度で迅速に検出する試料調整法及び検出法を開発し、人への伝播を未然に防止することを目的とする。

B. 研究方法

1) 感染因子を高感度で速やかに検出できる実験動物として人、牛、羊などプリオン病の宿主のプリオン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの開

発と、2) 感染因子を構成するプリオン蛋白(PrP)を免疫生化学的に高感度に検出する方法の開発の両面から、研究を進める。

C. 研究結果

1. プリオン蛋白、PrPScの高感度検出

1) PrPSc検出用の、特異性と親和性の高い抗体の作成

PrPの複数ヶ所のアミノ酸配列に一致した合成ペプチドに対するポリクローナル抗体と一部モノクローナル抗体も得られた。関連蛋白に対する抗体を含め10種以上作成された。PrPScのコアのN末端領域を含むペプチドに対する抗体は一般に高力価であった。次いでC末端領域に対する抗体が使用に耐えるものであった。

2) PrPSc検出用試料の調整

スクレイピーでは発症前から細網リンパ系組織にPrPScが蓄積されるが早期では微量である。また畜産物や医療用材原料などを汚染するプリオンは微量と推定される。このような微量プリオンのPrPScを検出するためには、選択的に効率良くPrPScを濃縮する試料調整が最も重要となる。今回、コラーゲンおよびゼラチンを対象とした試料調整法を確立した。試料容量は50mlで回収率が30%程度のため、なお改良の余地がある。大容量の血清などの蛋白溶液を対象とした試料調整法、抗体を用いた濃縮法、PrPScの金属塩等との親和性を利用した濃縮法など

の検討に入っている。

3) PrPScの検出系

試料調整法の改良と適当な抗体および最適なプロット条件の組み合わせにより、ウエスタンブロット法(WB法)で感染価にしておよそ 8×10^3 LD₅₀、感染脳重量にして20mg中のPrPScが検出可能な段階に至った。調整された試料をグアニジンで可溶化し、プレートに吸着させる方法を開発し、ELISA法も可能となった。化学発光を用いたELISA法を開発し、その感度はWB法の20倍であった。蛍光法は、試料によるクエンチング効果のため、組織から調整された試料の高感度測定は成功しなかった。

2. バイオアッセイ系の開発

1) ヒト・プリオンに対する高感受性のマウスの樹立

ヒト型のトランスジェニック・マウスを樹立したが、マウスPrP遺伝子の存在が影響して、潜伏期が予想したほど短くなかった。そこで、ヒト型のトランスジェニック・マウスとプリオン蛋白のノックアウトマウスを交配し、完全にトランスジェンだけが発現するというマウスを作成した。この樹立されたマウスはヒト・プリオンに対して高感受性であった。

2) ヒツジ型のトランスジェニック・マウス

羊PrPの発現が確認されたトランスジェニック・マウス4系統が樹立された。これらのマウスの羊スクレイプープリオンに対する感受性を感染試験を行い観察中である。一方、人型マウスの経験から、ヒツジ型のトランスジェニック・マウスをプリオン蛋白のノックアウトマウスと交配し、完全ヒツジ型の作製に入っている。

3) オリックス型トランスジェニック・マウス

牛プリオンに対して牛や羊より数千倍感受性が高いと考えられるシロオリックスのPrP遺伝子を導入したトランスジェニック・マウスの系統を樹立した。このマウスとプリオン蛋白のノックアウトマウスと交配して完全シロオリックス型を作成している。

D. 考察

抗原エピトープの違った抗体が幾つか用意できた。これらの抗体はPrPScの検出以外に、その構造研究にも有用と考えられる。

組織、液体試料中の微量PrPScを検出するための試料調整法として、従来からの、界面活性剤不溶物で蛋白分解酵素抵抗性の性質を利用した濃縮法には限界がある。このため、大容量の試料から濃縮する

ためには、PrPの銅イオン、ニッケルイオン等との高親和性等を利用したステップを加えることも必要と考えられる。

ヒト型トランスジェニックマウスより、ヒト型PrPだけを発現するマウスが有効なことが分かった。現在羊型トランスジェニックマウスの感染試験が進んでいるが、ヒト型と同様、マウス遺伝子の影響からか、予期したほど潜伏期は短くない。にヒツジPrPだけを発現するマウスが完成次第、感染試験を計画している。それぞれのPrP発現マウスの感染実験系でより潜伏期が短いことが証明できれば、細網リンパ系組織からPrPScが検出できるか否かを検討する必要がある。これらからPrPScを検出することによりより早期に診断可能となることが期待できる。僅か懸念されることは、b-アクチンプロモーターによるオリックス型PrP発現マウスでのプロモーターの影響である。感染試験によりこの点は明らかとなる。

E. 結論

PrPSc検出のための試料調整法は、対照が多様なため個々に対応する必要がある。血液、血清等について、これまでに開発できていない。次年度はこの点も解決する必要がある。ヒト型PrPだけを発現するマウスはヒトプリオンに高感受性であった。ウシ及びヒツジ型のキメラトランスジェニックマウスのヒツジスクレイプー感染試験は進行中であるが、高感受性とはいえない。ヒツジPrP及びオリックスPrPだけをそれぞれ発現するマウスの樹立が進行中である。

F. 研究発表

- 1) Komatsu, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Matsui, T. Shinagawa, M.: Characterization of the sheep apolipoprotein E Gene (Apo E) gene and allelic variations of the ApoE gene in scrapie Suffolk sheep. *Gene* 208:131-138, 1998.
- 2) Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y. and Shinagawa, M.: Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Animal Genetics* 29: 37-40, 1998.
- 3) Ishiguro, N., Shinagawa, M., Onoe, S., Yamanouchi, K. and Saito, T.: Rapid analysis of allelic variants of the sheep PrP gene by

- oligonucleotide probes. *Microbiol. Immunol.* 42: 579-582, 1998.
- 4) Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Shinagawa, M.: Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch. Virol.* 144: 177-184, 1999.
 - 5) Laplanche, J.-L., Hunter, N., Shinagawa, M., Williams, E.: In *Prion Biology and Diseases* (Prusiner, S.B. ed), Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. Cold Spring Harb or Laboratory Press (in press)
 - 6) Shimizu, S., Hoshi, K., Muramoto, T., Homma, M., Ironside, J.W., Kuzuhara, S., Sato, T., Yamamoto, T., Kitamoto, T.: Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques after cadaveric dural grafting. *Arch. Neurol.* (in press)
 - 7) Shibuya, S., Shin, R.-W., Higuchi, J., Tateishi, J., Kitamoto, T.: Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 43: 826-828, 1998.
 - 8) Shibuya, S., Higuchi, J., Shin, R.-W., Tateishi, J., Kitamoto, T.: Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 351:419, 1998.
 - 9) Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S., and Onodera, T.: Cellular prion proteins prevent apoptotic death of immortalized neuronal-precursor cell lines induced by serum- deprivation. (submitted)
 - 10) Onodera, T.: Prion disease. *Bioscience and Microflora* 17: 23-31, 1998.
 - 11) Takahashi, H., Takahashi, R.H., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, K., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T., Nagashima, K.: Characterization of antibodies raised against bovine- PrP-peptides. *J. NeuroVirol.* in press.
 - 12) Okada, Y., Abe, E. Komuro, K. and Mizuochi, M.: Heterosexual transmission of a murine AIDS virus. *J. Viro.* 72: 2541-2543
 - 13) Suruga, Y., Makino, M., Okada, Y., Tamaka, T., Clercq, E.D. and Baba, M.: Prevention of murine AIDS development by (R)-9- (2-phosphonylmethoxypropyl) adenine. *J. Acquir. Immune. Defic. Sydr.* 18: 316-322, 1998.

分担研究報告書

スクレイピー材料を用いた高感度検出系の開発

主任研究者	品川森一	帯広畜産大学畜産学部	獣医公衆衛生学
研究協力者	石黒直隆	帯広畜産大学畜産学部	獣医公衆衛生学
	根本卓弥	帯広畜産大学畜産学部	獣医公衆衛生学

研究要旨

コラーゲン及びゼラチンのプリオン汚染を異常型プリオン蛋白、PrPScを検出して判定するための試料調整法を開発した。試料溶液は粘稠性が高いため、ブロメリン処理あるいは、pHを中性に修正してコラゲナーゼ処理を行った。PrPScの濃縮にはポリエチレングリコール沈殿が有効であった。スパイク試験により、PrPScの回収率が40%程度で50mlのコラーゲンまで処理可能であった。

A. 研究目的

組織、動物由来物質中の汚染プリオンの構成蛋白である異常型プリオン蛋白、PrPScを免疫学的に検出してプリオン汚染を検知し、人及び動物へのプリオンの伝播を未然に防止するための、PrPSc高感度検出法を開発することを目的とする。

B. 方法

動物由来物質として市販のコラーゲン及びゼラチンにスクレイピー感染マウス脳抽出物を添加して汚染材料を用意した。コラーゲンおよびゼラチンの粘度を低下させるために、各種蛋白分解酵素を検討した。粘度の低下した材料からPrPScを選択的に沈殿濃縮する方法として、各種蛋白沈殿法を検討した。PrPScの検出にはウエスタンブロット法を用いた。

C. 結果

PrPScの損失を最小限に抑えてコラーゲンの粘度を低下させるために、ブロメリン消化及びコラーゲン溶液のpHを中性に修正後にコラゲナーゼ消化する方法が適していた。酵素処理により粘稠性の低下した溶液から、夾雑蛋白の沈殿を最小に止めてPrPScを定量的に沈殿させるためには、1%NaCl存在下で8%ポリエチレングリコール沈殿を行う方法が最も優れていた。添加したスクレイピーマウス脳抽出物中に混在するPrPCの除去を目的としてProteinase Kで処理するとPrPScはおよそ20%が消化消失することが分かった。このような消失を分を考慮せずに計算された、5ml溶液からの添加PrPScの回収率は40~50%、50mlからは30%程度であっ

た。

D. 考察

コラゲナーゼによるPrPScの消化は認められないし、また1%NaCl存在下で8%ポリエチレングリコール沈殿により上清にはPrPScの~3%程度が残存するだけであり、Proteinase K処理で20%消失したとしても、最終的な回収率が30~50%と予想外に低かった。この最大の理由は10ml~50mlの遠心管から沈殿を定量的に微量遠心管に移すことができないことにあると推定された。使用器材のシリコン化あるいは特別な器材を使用することなどである程度は改良が可能と考えられる。

E. 結論

コラゲナーゼあるいはブロメリン処理によりコラーゲンの前処理が可能であった。PrPScの回収には1%NaCl存在下で8%ポリエチレングリコール沈殿が有効であった。使用器材の改良が回収率の向上に必要と推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komatsu, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Matsui, T. Shinagawa, M.: Characterization of the sheep apolipoprotein E Gene (Apo E) gene and allelic variations of the ApoE gene in scrapie Suffolk sheep. *Gene* 208: 131-138 (1998).
- 2) Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H.,

Toyoda, Y. and Shinagawa, M.: Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Animal Genetics* 29: 37-40 (1998).

- 3) Ishiguro, N., Shinagawa, M., Onoe, S., Yamanouchi, K. and Saito, T.: Rapid analysis of allelic variants of the sheep PrP gene by oligonucleotide probes. *Microbiol. Immunol.* 42: 579-582 (1998).
- 4) Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Shinagawa, M.: Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch. Virol.* 144: 177-184 (1999).
- 5) Laplanche, J.-L., Hunter, N., Shinagawa, M., Williams, E.: In *Prion Biology and Diseases* (Prusiner, S.B. ed), Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink] Encephalopathy. Cold Spring Harbor Laboratory Press (in press).

分担研究報告書

抗プリオン抗体による異常プリオンの高感度検出系の開発及び抗14-3-3抗体及び脊髄を用いた診断系の開発

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部
研究協力者 高橋礼典 国立感染症研究所 感染病理部
倉田 毅 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨

プリオン蛋白に対する4種の抗体を用い、正常プリオン蛋白の認識されない抗原部位を特定した。現在までのところ4種の抗体は異常プリオン蛋白を可溶化液中にて認識するため、異常プリオン蛋白のみを認識させる抗原部位として採用できる可能性があると考えられた。また抗14-3-3蛋白モノクロナール抗体のサブタイプ特異性を決定し今後の検出系、診断系開発を可能にした。

A. 研究目的

異常プリオン蛋白を高感度に検出するためにバイオアッセイを対象からはずし、免疫的に異常プリオン蛋白の高感度検出系を開発することを目的とした。異常蛋白の検出法とともに脊髄液中に異常高値を示す蛋白(14-3-3)の検出法及び異常プリオン蛋白の集積する脳以外の臓器の検索を目的とした。

B. 研究方法

1. ウシプリオンペプチドをウサギへ免疫し、Ab1, 2, 3, 4の4種の抗体を得た。
2. 4種の抗体Ab1, 2, 3, 4について正常ヒト脳組織、CJD脳組織を対象とし、免疫沈降法を用いて認識の有効性を調べた。
3. 14-3-3蛋白のモノクロナール抗体を4種作成し、サブタイプに対する特異性を検索し、プリオン病の特異性と感度の向上を目指した。アイソタイプ特異性を解析した。

C. 結果

1. Ab1, 4は正常プリオン蛋白をよく免疫沈降できたが、Ab2, 3は全くできなかった。しかし異常プリオン蛋白をAb1, 2, 3, 4の全てが免疫沈降することができ、沈降物はPKに耐性を示した。よってAb2, 3は異常プリオン蛋白だけを認識する可能性が強いと考えられた。

2. 得られたモノクロナール抗体はサブタイプiota, tau, zetaに対して特異性を示す抗体であることが判

明した。

D. 考察

4種の抗体は正常プリオン蛋白と異常プリオン蛋白に対して免疫的なアフィニティーに極端な差があった。正常プリオンを認識する抗体の抗原部位は、蛋白の外側に位置し、認識できない抗体の抗原部位は内部に位置している。しかし異常プリオンに対しては全ての抗体が認識できるようになっていた。異常プリオンが免疫沈降される場合に、抗体抗原複合体によって沈降されるのか、異常プリオンの沈降しやすい性質により非特異的に沈降するのかを今後検索するべきであると考えます。

また脊髄液を用いた早期診断法として注目される14-3-3蛋白について異なるサブタイプを認識するモノクロナール抗体が得られたため今後より特異性の高い診断系を開発できると考えられた。

E. 結論

正常プリオンでは認識されない抗原部位が明らかになった。異常プリオン蛋白は現在の免疫沈降法では全ての抗体によって認識された。それと同時に異常プリオン蛋白が可溶化した状態で存在し抗体によって認識されるのかどうか新たな問題となった。14-3-3蛋白に対してサブタイプを認識する抗体を得、今後の検出系、診断系開発が可能になった。

F. 研究発表

1. Takahashi, H., Takahashi, R. H.,

Hasegawa,H., Horiuchi,M., Shinagawa, T.,
Yokoyama,K., Kimura,K., Haritani,M.,
Kurata,T., Nagashima,K. Characterization of
antibodies raised against bovine-PrP-
peptides. J.NeuroVirol. in press.

2. 学会発表 なし

分担研究報告書

スクレイピー材料を用いた高感度検出系の開発

分担研究者 神山恒夫 国立感染症研究所 獣医科学部

研究要旨

変性プリオンの高感度検出系のモデルとしてTSE発症マウス脳を用いた。感染性プリオンを接種したマウスの脳内のProteinase K耐性のプリオンは接種後95日目までは認められなかったが、118日目以降に検出されるようになった。マウスプリオンペプチド (THNQWNKPSKPKTNLK) に対するウサギ抗血清との反応性は接種マウス脳をProteinaseK処理することにより著しく増加した。

A. 研究目的

変性プリオンの高感度検出系のモデルとしてTSE発症マウス脳を用い、発症時期および検出条件の検討を行った。

B. 研究方法

1. 抗ペプチド血清

すでに知られているマウスプリオンタンパク質のアミノ酸配列をもとに、蛋白質構造解析ソフトウェアPeptidestructureを用いて分子内各領域の親水度、表在率、らせん構造を計算した。計算された構造パラメータから抗原性が強いと予想された領域のペプチド抗原 (THNQWNKPSKPKTNLK) を、multiple antigenic peptide法によって合成した。得られたペプチドをウサギに免疫して抗血清を作成した。

2. TSE発症マウス脳

TSEプリオン接種後28日、75日、118日、および165日目のマウスの脳は、堀内と品川 (帯広畜産大学) より入手した。

3. 変性プリオンの検出

感染マウス脳から膜画分を調整し、proteinase Kで処理した。SDS処理後電気泳動を行い、Western blotによって抗血清との反応性を調べた。

C, D. 研究結果と考察

Western blotでは感染後118日目にごく弱い反応性が認められるようになった。感染165日目の脳は強い反応性を示した。このことは、変性プリオンの蓄積は感染後の一定時間後に急速に進むことを示しており、逆に、潜伏期間中の検出が難しいことを示している。

これらの脳の膜画分をproteinase Kで処理したところ著しく反応性が上昇した。検出された主要抗原のサイズは約27 kDaと約32 kDaで、このうち32 kDa抗原が早く出現し、抗原量も多いことが示された。したがって、高感度検出の標的抗原としては32 kDa抗原が適当であると考えられた。しかし、感染75日以前のマウス脳はproteinase K処理後もWestern blotでは陰性の成績であった。

proteinase K処理による反応性の増加の程度は処理時間に依存し、120分までは処理時間とともに抗体との反応性が上昇する傾向が認められた。したがって、変性プリオンの高感度検出を行う場合にはproteinase処理は必須であると考えられる。さらに他の方法による検出感度の増感の可能性についても検討中である。

E. 結論

感染性プリオンを接種したマウスの脳内のProteinase K耐性のプリオンは接種後95日目までは認められなかったが、118日目以降に検出された。マウスプリオンペプチドに対するウサギ抗血清との反応性は接種マウス脳をProteinaseK処理することにより著しく増加した。

F. 研究発表

なし

プリオン病の高感度診断技術の開発

－食品中のプリオンタンパクの高感度検出法の開発に関する研究－

分担研究者 澤田 純一 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部長

研究要旨

プリオンタンパク (PrP) のサンドイッチ ELISA の確立を目的として、ウサギポリクローナル抗体の作製を行った。その結果、PrP の N 端側付近のペプチドを抗原として作製した抗ウシプリオンペプチド抗血清 1 種類、及び、PrP の N 端側および C 端付近のペプチドを抗原として作製した抗ヒトプリオンペプチド抗血清 2 種類が、プリオンタンパクのイムノブロッティングに使用できることを確認した。特に、ヒト PrP に対しては、ヒト PrP 上の異なるエピトープを認識するウサギ抗血清を得ることができた。

また、ヒト正常プリオンタンパクが、ヒトグリオーマ細胞株 T98G に発現していることを見出した。この細胞株は、複合型アスパラギン結合型糖鎖を持つヒト PrP^C の調製ソースになり得る。

A. 研究目的

伝達性海綿状脳症の原因物質である異常プリオンタンパクのヒトへの暴露を防ぐために、食品や医薬品等の異常プリオンタンパクによる汚染の有無を確認することが望まれるが、異常プリオンタンパクの検出法として迅速かつ簡便な高感度検出法のないことが大きな問題の一つとして挙げられている。本研究では、食品への汚染を想定したウシ由来プリオンタンパクの検出法の確立を目的に、免疫化学的手法によるプリオンタンパクの高感度検出法及び検体の前処理法を開発し、標準試験法を確立する。そのために、以下の項目を検討する。

1. 抗 PrP 抗体の作製と抗体の特性の解析
2. サンドイッチ ELISA の開発と、そのためのプリオンタンパク試料の前処理法の検討
3. 脳組織、筋肉組織中のプリオンタンパクの抽出・濃縮方法の検討
4. 大腸菌で発現させた組換えウシプリオンタンパクの調製
5. 細胞株のプリオンタンパクの調製

B. 研究方法

1. 抗プリオンペプチド抗体の作製

ヒト、ウシ、ラットのプリオンタンパクの N 端側および C 端付近のペプチドを、MBS を架橋剤にして BSA または HSA に結合させた。抗原の構造は次の通りである。

BSA-Cys-human PrP(95-114) [アミノ酸配列は、CTHSQWNKPSKPKTNMKHMAG]
Bovine PrP(104-123)-Cys-HSA
[GGTHGQWNKPSKPKTNMKHV C]

rat PrP(90-106)-Cys-BSA
[SQGGGTHNQWNKPSKPKC]
BSA-human PrP(214-230)
[CITQYERESQAYYQRGS]
HSA-bovine PrP(225-241)
[CITQYQRESQAYYQRGA]
BSA-rat PrP(214-231) [CVTQYQKESQAYYDGRRS]
これをウサギに 6 回免疫した。血清の抗体価は、ペプチド-OVA を固相抗原にして ELISA で測定した。

2. イムノブロッティング

ウシ脳 P2 画分またはヒト培養細胞株 T98G の膜画分を試料とし、SDS-PAGE を行った。1 次抗体として、ウサギ抗血清、マウスモノクローナル抗体 BSPX-54 (抗ウシ PrP、帯広畜産大学の堀内基広博士、品川森一博士より分与)、3F4 (抗ヒト PrP) を用いた。HRP 標識 2 次抗体を用いる発色法または発光法で検出した。

3. T98G 細胞の培養

RPMI1640 培地 (+10% FCS) を入れた 90mm dish で培養し、4 日毎に培地交換した。4-16 日間培養した。

C. 研究結果

1. 抗プリオンペプチド抗体の作製

ヒト、ウシ、ラットの各 PrP の N 端側および C 端付近のペプチドを抗原として、ウサギポリクローナル抗体の作製を行った。その結果、ELISA で抗原ペプチドに反応する抗血清が得られた。次に、これらの正常プリオンタンパクに対するイムノブロッティングでの反応性を調べた。その結果、ウシ PrP の N 端側付近のペプチドを抗原として作製

した抗ウシプリオンペプチド抗血清（抗 BPN 抗血清）が、ウシ脳由来の PrP^Cに反応することがわかった。ヒト PrP の N 端側および C 端付近のペプチドをそれぞれ抗原として作製した抗ヒトプリオンペプチド抗血清（抗 HPN 抗血清、抗 HPC 抗血清）が、ヒトグリオーマ細胞株 T98G 由来の PrP^Cに反応することがわかった。また、抗 HPN 抗血清は、ウシ脳由来の PrP^Cにも反応することがわかった。

今回の抗血清作製で、ヒト PrP 上の異なるエпитープを認識する 2 種類のウサギ抗血清を得ることができた。

2. ヒトグリオーマ細胞株 T98G での正常プリオンタンパクの発現

ヒト正常プリオンタンパクが、ヒトグリオーマ細胞株 T98G に発現していることを見出した。培養開始 4 日後の対数増殖期には PrP 含量が低く、8 日から 16 日後の定常期に PrP 含量が増大することが明らかになった。

D. 考察

これまでに、プリオンタンパクの高感度検出法をめざして、化学発光法を利用した ELISA の開発研究が報告されているが、食品への汚染などの際の極微量のプリオンタンパクを検出するためには、前処理法の開発と同時に、さらに検出感度を向上させる必要がある。そのための方策の 1 つとして、プリオンタンパクのサンドイッチ ELISA の開発が考えられる。今年度は、サンドイッチ ELISA に使用するための、ウシ PrP とヒト PrP に対する抗ペプチドウサギ抗血清を得ることができた。イムノプロットングに使用できたことから、これらの抗血清は、変性させた PrP^C及び変性させた PrP^{Sc}を認識できると推測される。現在、ウシ PrP とヒト PrP の N 端側付近のペプチド配列を認識するマウスモノクローナル抗体、及びウシ PrP の C 端付近のペプチド配列を認識するマウスモノクローナル抗体が、既に報告されている。それらと、今回得られたウサギ抗血清を組み合わせることで、変性させた PrP^{Sc}のサンドイッチ ELISA を用いるイムノアッセイが構築できる。次年度は、今回得られた抗血清を用いてサンドイッチ ELISA の条件検討を行うとともに、この ELISA に適したモノクローナル抗体の選択も行う。また、前処理法の検討も行う予定である。

今回、ヒト正常プリオンタンパクが、ヒトグリオーマ細胞株 T98G に発現していることを見出した。これまでに、正常プリオンタンパクまたはその mRNA を発現している培養ヒト細胞株がいくつか報告されているが、今回グリア系細胞株でプリオンタンパクの発現を確認した。in vitro 実験に利用しやすいヒトプリオンタンパク発現細胞株がない現状において、今後の解析は意義がある。また、N-グリコシド結合糖鎖をもつ正常プリオンタンパクの抽出ソースになり得ると期待される。

E. 結論

平成 10 年度は、プリオンタンパク (PrP) のサンドイッチ ELISA の確立を目的として、ヒト、ウシ、ラットの各 PrP の N 端側および C 端付近のペプチドを抗原として、ウサギポリクローナル抗体の作製を行った。その結果、PrP の N 端側付近のペプチドを抗原として作製した抗ウシプリオンペプチド抗血清 1 種類、及び、PrP の N 端側および C 端付近のペプチドを抗原として作製した抗ヒトプリオンペプチド抗血清 2 種類が、イムノプロットングで正常プリオンタンパクに対して反応することを確認した。ヒト PrP に対しては、PrP 上の異なるエпитープを認識するウサギ抗血清を得ることができた。

また、ヒト正常プリオンタンパクが、ヒトグリオーマ細胞株 T98G に発現していることを見出した。これを用いることで、複合型アスパラギン結合型糖鎖を持つヒト PrP^Cの調製が可能になる。

F. 研究発表

学会発表

1. 菊池裕、山崎壯、高鳥浩介、澤田純一：正常プリオンタンパクのヒト・グリオーマ細胞細胞における発現機構。第 71 回日本生化学会大会（1998 年 10 月、名古屋）
2. Yutaka Kikuchi, Takeshi Yamazaki, Kosuke Takatori, and Jun-ichi Sawada: High-level expression of cellular form of prion protein in human glioblastoma cell line T98G. Infections of the nervous system: host-pathogen interactions, March, 1999, New Mexico, USA.

プリオン蛋白質の高感度検出系の開発

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所室長

研究要旨 ヒトプリオン蛋白質のC末端に相当するペプチドを合成し、マウスに免疫して単クローン抗体の作製を試みた。最終的に1株の抗体産生ハイブリドーマを得たが、作られた抗体はペプチドのみに反応し、プリオン蛋白質を認識しなかった。そこで、抗原として用いるためにマウス細胞株にヒトプリオン遺伝子を導入することで安定にヒトプリオン蛋白質を発現する細胞株を樹立した。現在、この細胞を用いて免疫を行っている。また、樹立した細胞株を解析したところプリオン蛋白質は細胞表面に存在し、トリプシンによって細胞表面から切断されることが明らかとなった。また、培養上清を濃縮し、プリオン特異的抗体が結合した磁気ビーズと反応後、ウエスタンブロットを行ったところプリオン蛋白質が検出された。

A. 研究目的

Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) は100万人に1人の頻度で発病する中枢神経の疾患である。血しょう分画製剤は数万人の血液から作られるために、これまでにドナーが採血後にCJDを発症したケースがあり、製剤の安全性を確保する上で問題となっている。そこで、より血液製剤の安全性を高めるために、血液及び血液製剤からプリオン蛋白質を高感度に検出する方法の確立と除去法の開発を目的とした。

B. 研究方法

プリオン蛋白質のC末側で、抗原性が高い部位に相当するペプチドを合成し、KLH (keyhole limpet hemocyanin) をコンジュゲート後、マウスに免疫することで単クローン抗体を作製した。また、Balb/c マウス由来の繊維芽細胞株 (3T3) にヒトプリオン遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入し、安定にヒトプリオン蛋白質を発現する細胞株を樹立した。この細胞株をアジュバントと共にマウスに免疫した。さらにプリオン蛋白質の生物学的特性を解析するために、プリオン特異的抗体を用

いて、細胞での局在や血漿の発現に与える影響についてフローサイトメーターとウエスタンブロット法で解析した。

C. 研究結果

B10 マウスと Balb/c マウスにペプチドを免疫したが抗体価の上昇が悪く、比較的高い抗体価を示したマウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製した。最終的に1株の抗体を産生しているハイブリドーマを樹立したが、ペプチドのみに高い親和性を示すものの、プリオン蛋白質には反応しなかった。そこで、ペプチドでなくプリオン蛋白質全体を抗原にすることを考え、3T3細胞にヒトプリオン遺伝子を導入し発現させた。発現が不安定なのでクローニングを繰り返すことで安定に発現する細胞株を得た。3F4プリオン抗体を用いてプリオン蛋白質の局在を検索すると細胞表面に存在し、フローサイトメーターで検出することができた (Fig.1)。ウエスタンブロット法で検出すると、期待されるサイズより小さい分子量のバンドが認められたので、EDTA 処理の細胞を用いたところ32K付近にスメアーをひくバンドがみとめられた。

このバンドはトリプシン処理の細胞では非常に少なかった。また、フローサイトメーターでの解析でも EDTA 処理の細胞はトリプシン処理に比して蛍光強度が強かった。さらに、ヒト血清で細胞株を 2 時間処理すると、非動化した血清に比べて無処理の血清のほうが蛍光強度が減少した (Fig2)。一方、細胞上清を集め、硫酸で濃縮し、さらに抗体を付けた磁気ビーズでプリオン蛋白を集め、ウエスタンブロット法を用いて検出したところプリオン蛋白が検出された (Fig.3)。

D. 考察

ペプチドを用いた免疫法では C 末端に対する抗体の作製は難しいと思われた。今回、樹立したヒトプリオン蛋白を発現する細胞株を抗原に用いれば、他の抗原性の高い部位に対する抗体を作製できる可能性がある。また、正常プリオン蛋白は細胞表面に発現し、容易に切断されることが確認された。32K 付近のバンドが消失することから、糖鎖がついたプリオン蛋白が切られると推定された。培養上清からプリオン蛋白が検出されたことは、壊れた細胞の断片を見ている可能性も否定できないが、培養液中に切られたプリオン蛋白が存在することを示唆している。非動化していない血清の前処理によって蛍光強度が減少したのは、プリオン蛋白が GPI アンカーに付いていることを考えると、補体によって切断されることが示唆されている。マウスにアダプトしたヒトプリオン株を用いた実験から血漿中に感染性があることが示され、量的に少ないことが推定されているが中枢神経系に直接用いる場合は注意する必要がある。

E. 結論

ヒトプリオン蛋白に対する単クローン抗体を作製することはできなかった。しかし、マウスの細

胞にヒトのプリオン蛋白を発現する細胞株を樹立した。プリオン蛋白は細胞表面に存在し、1 部は切られて培養液中に存在していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okada, Y., E. Abe, K. Komuro, and M. Mizuuchi.: Heterosexual transmission of a murine AIDS virus. *J. Virol.* 72;2541-2543. 1998.

Suruga, Y., M. Makino, Y., Okada, H. Tamaka, E. D. Clercq, and M. Baba.: Prevention of murine AIDS development by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl) adenine. *J. Acquir. Immune. Defic. Sydr.* 18:316-322; 1998.

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、青木陽一郎、小室勝利：抗ヒトプリオン蛋白抗体の作製と検出法の開発。第 46 回日本ウイルス学会。1998 年。

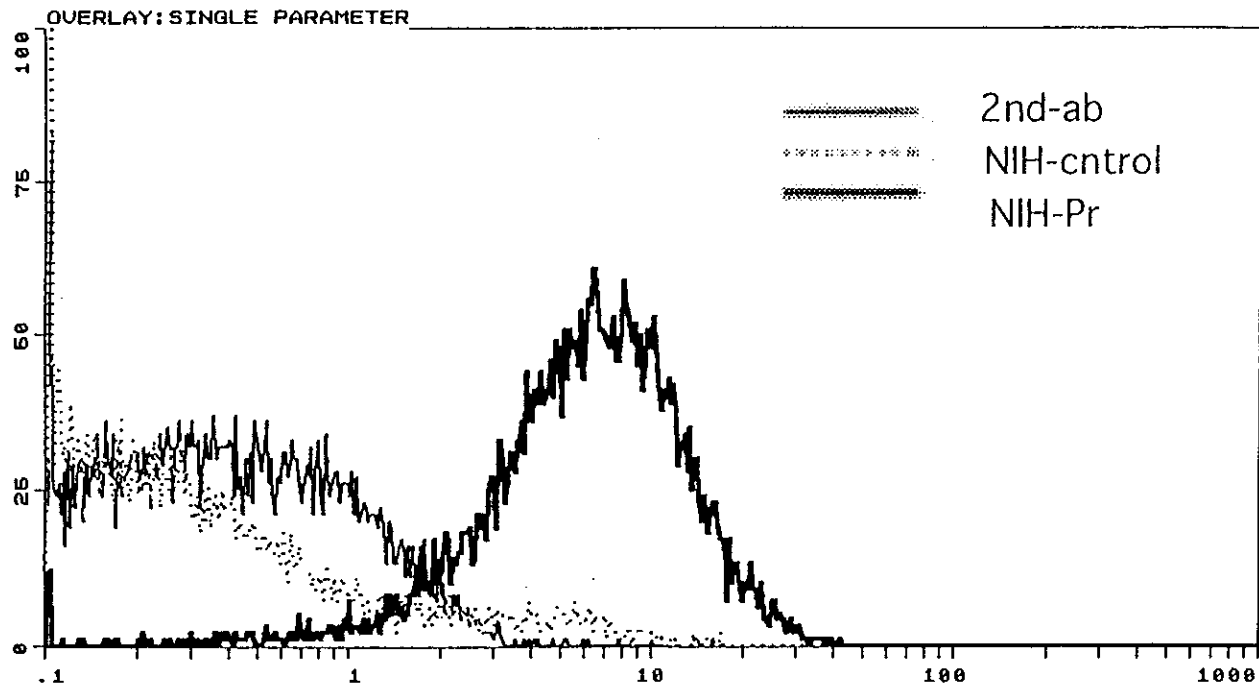


Fig.1. Expression of Prion Protein on Transfected NIH-3T3

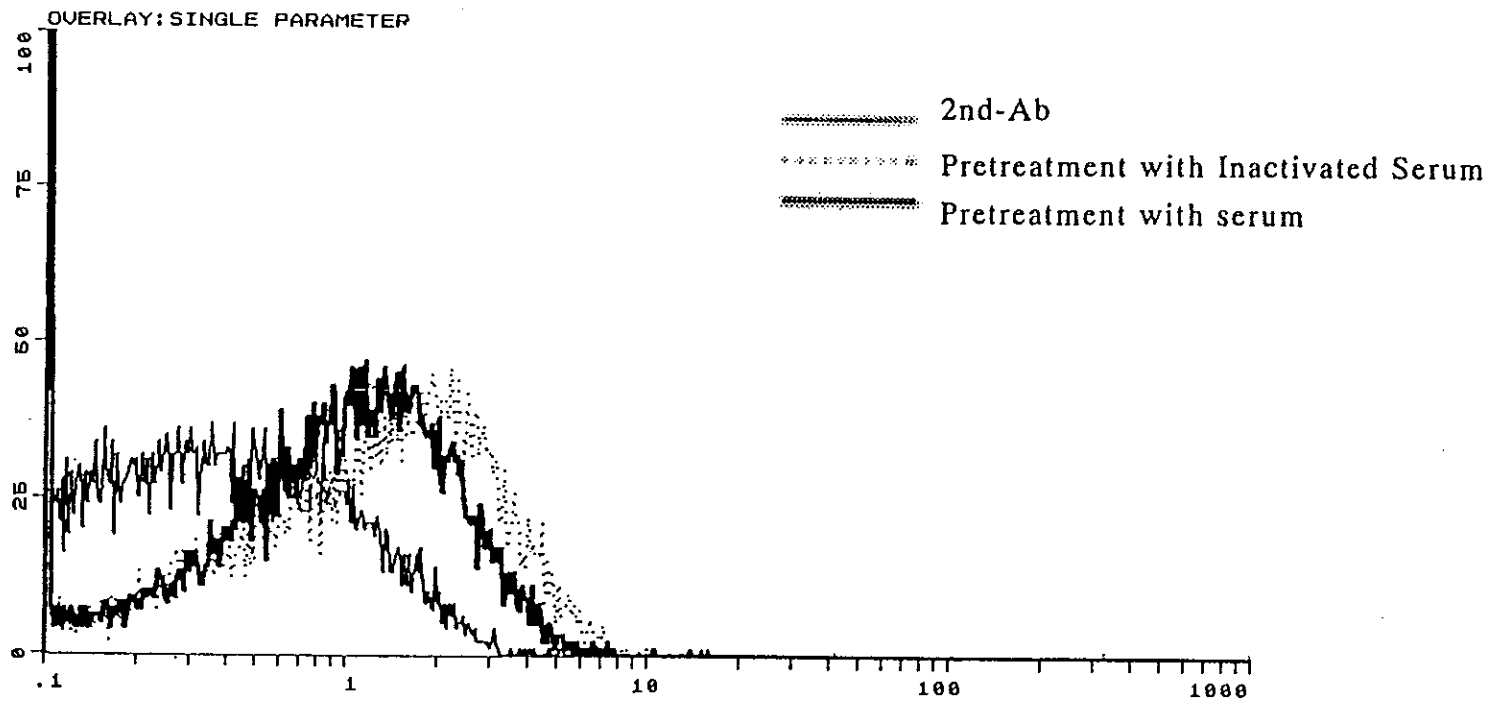


Fig.2. Effect of Complement on Cell Surface Prion Protein

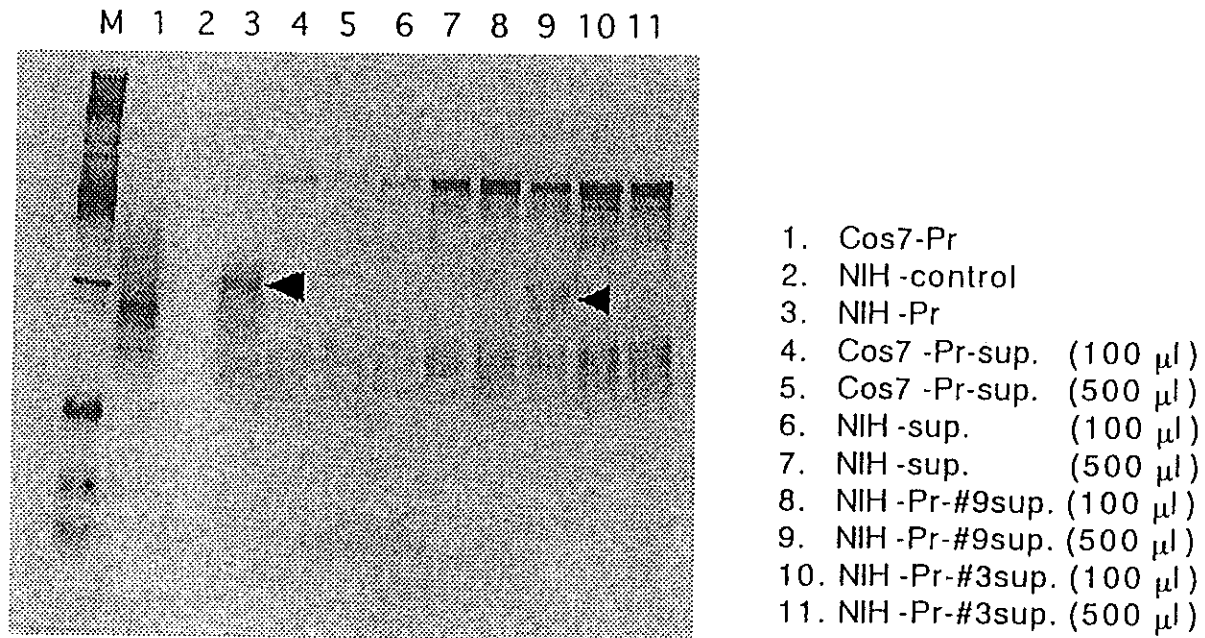


Fig.3. Detection of Prion Protein on Transfected Cells and Supernatant

分担研究報告書

プリオン病のバイオアッセイに関する研究

分担研究者 北本哲之 東北大学大学院医学研究科 病態神経学

研究要旨

ヒト・プリオンを通常マウスに接種すると400日以上潜伏期で、100%は発症しない。マウスプリオン蛋白を発現しているヒト型のトランスジェニックは300日から340日で100%発症した。プリオン蛋白ノックアウトマウスと交配して得た、ヒトプリオン蛋白だけを発現するマウスは平均150日で発症した。即ちヒト・プリオンに対する高感受性のマウスの作製に成功した。ヒツジ・プリオンに対する高感受性のモデル動物を作製している。

A. 研究目的

プリオン病の高感受性バイオアッセイ法を確立するにあたり、最も問題となるのはそれぞれのプリオン病にはいろいろな宿主動物がいることである。たとえば、CJDの場合はヒト型のプリオン蛋白の導入モデルが必要となり、スクレピーの場合はヒツジ型が必要となる。そこで、それぞれの宿主動物に即した遺伝子導入モデルを作製することが本研究の主な目的である。

B. 研究方法

マウスのプリオン蛋白遺伝子のゲノムをクローニングして、自然なプリオン蛋白の発現が得られるトランスジェニック・ベクターを作製した。作製したベクターのプリオン蛋白領域(ORF)のSmaIサイトからBstEIIサイトまでをそれぞれヒト型、ヒツジ型、ウシ型のプリオン蛋白遺伝子に置換してトランスジェニックマウスを作製することにした。作製したトランスジェニック・マウスは、それぞれの動物種のプリオンを脳内に接種し、感染実験を行った。具体的には、ヒト・プリオンとして、コドン129Met/Met、コドン219Glu/Gluの孤発例のCJDの剖検脳乳剤を用いた。また、ヒト型のトランスジェニック・マウスはプリオン蛋白遺伝子のノックアウト・マウスと交配してヒト型プリオン蛋白のみを発現するマウスの作製も行った。

C. 研究結果

すでに、ヒト型、ヒツジ型、ウシ型のトランスジェニックは作成済みであり、それぞれのプリオン蛋白の発現も蛋白レベルで確かめている。今年度は、ヒ

ト型トランスジェニックの感染実験の結果を報告する。ヒト型のトランスジェニックは、まだマウスのプリオン蛋白が発現しており、これにヒト・プリオンを接種すると300日から340日で100%発病した。次にノックアウトマウスと交配して、マウスのプリオン蛋白が発現せずヒト・プリオン蛋白のみ発現しているマウスに感染実験を行ったところ平均150日に潜伏期が短縮した。現時点で、ヒト・プリオンに対して最も感受性の高い動物モデルである。

D. 考察

ノックアウト・バックグラウンドで潜伏期が短縮される事実は良く知られている。しかし、我々のプリオン蛋白はC末端をマウス型としてProteinXと反応しやすいORFに変更しているにも関わらず潜伏期の短縮がみられたことは興味深い。これはProteinXとの関連よりも単純にマウスのプリオン蛋白が阻害的に働いているかもしれない可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト・プリオンに対する高感受性のマウスの作製に成功した。今後この方法論で、ヒツジ・プリオンに対する高感受性のモデル動物を作製してゆく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu S, Hoshi K, Muramoto T, Homma M, Ironside JW, Kuzuhara S, Sato T, Yamamoto T, Kitamoto T: Creutzfeldt-Jakob disease

with florid plaques after cadaveric dural grafting. Arch. Neurol. (in press)

- 2) Shibuya S, Shin R-W, Higuchi J, Tateishi J, Kitamoto T. Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 43: 826-828,1998
- 3) Shibuya S, Higuchi J, Shin R-W, Tateishi J, Kitamoto T. Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 351:419, 1998

分担研究報告書

白オリックスプリオン遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの作成及び ノックアウトマウスとの交配

分担研究者 小野寺 節 東京大学農学部応用免疫学教室

研究要旨

オリックス型トランスジェニックマウスを作成した。現在感染症研究所獣医科学研究部においても繁殖中である。

A. 研究目的

牛型プリオン病原体について牛や羊の数千倍感受性が高いと考えられるオリックスについてプリオン遺伝子をクローニングして、遺伝子構造を決定する。この分離した遺伝子について、すでに我々の開発しているプリオン遺伝子ノックアウトマウスを用いてトランスジェニック動物を作製する。

B. 研究方法

国立科学博物館より供与された3種の野生反芻獣よりDNAを抽出した。PCR法により得られたそれぞれのDNA断片をクローニングし、塩基配列を決定した。さらに、シロオリックスプリオン蛋白(oryx PrP: o-PrP)を全身で過剰発現するトランスジェニックマウス作製のためにアクチンプロモーターの支配下にo-PrPを組み込んだ。o-PrPを導入して得られた4系統のトランスジェニックマウスはサザンブロット法とPCR法によってトランスジーンが存在を検討した。プリオン遺伝子について、すでに我々が開発しているノックアウトマウスを用いてトランスジェニックマウスを作製する。

C. 研究結果

o-PrPは256個のアミノ酸から成り、一般にプリオン遺伝子に特徴的な配列や、部位はいずれもよく保存されていた。シロオリックスとヒツジにおける相違は1アミノ酸残基であった。得られた4匹のマウスでPrPの存在が確認され、この4系統について繁殖を行いF1を得て解析を行った。繁殖は現在まで2回行い、1回目の繁殖では11%(4/34)のマウスでo-PrPが確認され、2回目の繁殖では19%(5/27)のマウスで確認された。さらに、F1を用いてF2を作製したところ、38%(11/29)のマウスでo-PrPが

確認された。

D. 考察

PrPを持つトランスジェニックマウスに対し、ノーザンハイブリダイゼーションとRT-PCRを行い組織におけるo-PrPのmRNAの発現率を確認する予定である。これらの結果より、o-PrPトランスジェニックマウスの有用性を確認する。伝達性海綿状脳症はヒトや、ヒツジ、ウシなど多くの哺乳動物に見られる神経変性疾患であり、プリオン蛋白の異常によって起こるプリオン病である。シロオリックスやムフロンなどの野生反芻獣のプリオン発症までの潜伏期間はヒツジのそれよりも短い。一般に海綿状脳症の伝達性および発症までの期間は各種のプリオン蛋白の数個のアミノ酸の違いによるという可能性が示唆されている。また、最近Protein Xにより、感受性を高める独特の塩基配列がプリオン遺伝子中に存在するの仮説もたてられている。そこでプリオン蛋白遺伝子の構造が明らかにされたいない3種の野生反芻獣(ムフロン、ターキン、シロオリックス)のプリオン蛋白遺伝子の構造を比較した。

E. 結論

他動物種よりも潜伏期の短いシロオリックスのプリオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いた迅速な高感度検出系の確立を目的として研究を行った。トランスジェニックマウス独自の感染実験も可能であるが、コロニーの拡大を計画しなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表