

平成10年度 厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

研究報告書

動物組織由来医薬品等原材料の異常プリオンタンパク汚染の  
高感度検出法の開発 （H10-医薬-039）

澤田 純一

（国立医薬品食品衛生研究所）

平成11年 4月 9日

内容

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

主任研究者 澤田 純一

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

主任研究者 澤田 純一

分担研究者 品川 森一

分担研究者 菊池 裕

動物組織由来医薬品等原材料の異常プリオンタンパク汚染の高感度検出法の開発

主任研究者 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

本研究は、体内または体表面に直接、時には長期間投与される医薬品・医薬部外品・化粧品類（以下、医薬品等と略す）及びそれらの原材料を対象とし、医薬品等原材料中へのウシ伝達性海綿状脳症（BSE）病原体の汚染を想定して、異常プリオンタンパクの高感度免疫化学的検出法の開発、及び、*in vitro* 細胞培養系による高感度検出法の開発を目的とする。そのために、（１）免疫化学的検出法の一層の高感度化のための、高親和性抗体の作製と高感度 ELISA の開発（２）医薬品等原材料に混入した微量のプリオンタンパクの濃縮方法の開発、（３）細胞培養系を用いた *in vitro* バイオアッセイ法の検討を行う。

平成10年度（初年度）は、次のような検討を行った。（１）抗ウシプリオンタンパク抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）を作製し、その反応特性を解析した。その結果、ウシプリオンタンパクのイムノプロットングに利用可能なポリクローナル抗体が得られた。（２）コラーゲンおよびゼラチン中の汚染プリオンを検出するための試料処理法の検討し、酵素処理（プロメリン、コラゲナーゼ）とポリエチレングリコール沈殿を組み合わせることによってプリオンを抽出することができた。（３）正常プリオンタンパクを発現しているヒト培養細胞株を見出し、その細胞におけるプリオンタンパクの発現量と培養条件との関連を解析した。その結果、プリオンタンパクの発現量が細胞密度に依存することを見出した。

分担研究者

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所・  
衛生微生物部  
主任研究官

品川 森一 帯広畜産大学・  
獣医公衆衛生学教室  
教授

A. 研究目的

伝達性海綿状脳症（プリオン病）の原因物質である異常プリオンタンパクの、食品、医薬品、医療材料、およびそれらの原材料への混入が、国際的問題になっている。我が国でも、輸入されたヒト硬膜を介してプリオン病患者が発生している。医薬品、医薬部外品、化粧品にはウシ由来成分が多数含まれている。幸いに、医薬品等中に含まれるウシ由来成分からウシ伝達性海綿状脳症

（BSE）が伝達したと考えられる症例は報告されていないが、今後外国産原材料から感染事故が起こる可能性は否定できない。医原性プリオン感染を防ぐためには、医薬品、医療材料等の異常プリオンタンパクによる汚染の有無を確認し、プリオンの混入を排除することが有効である。異常プリオンタンパクの検出法としては、バイオアッセイ

法が高感度であるが、迅速性、簡便性に欠ける。医薬品等原材料に混入した微量の異常プリオンタンパクの検出法には、現在のバイオアッセイ法のみでは不十分であり、免疫化学的手法を利用する高感度検出法の開発が望まれている。また、これまでに報告されている異常プリオンタンパクの検出法の多くは、プリオン病に罹った生体組織からの検出であり、脳組織という異常プリオンタンパクの含量が最も高い試料を対象にしており、脳以外の生体組織からの検出や、医薬品等原材料、医療材料の検査にはそのままでは適用できない。医薬品等原材料の検査には、一層の高感度化と、個々の検体の種類に応じた適切な前処理（抽出、濃縮など）が必須とされている。

そこで、本研究では、医薬品等原材料中への BSE 病原体の汚染を想定して、その高感度検出法の開発を行う。また、*in vitro* 細胞培養系による高感度検出法の開発も検討する。そのために、（１）免疫化学的検出法の一層の高感度化のための、高親和性抗体の作製と高感度 ELISA の開発、（２）医薬品等原材料に混入した微量のプリオンタンパクの濃縮方法の開発、（３）細胞培養系を用いた *in vitro* バイオアッセイ法の検討を行う。それによって、実際の医薬品等原材料中の異常プリオンタンパク検出に必要な基本分析方法を開発し、医薬品等製造企業や公的検査機関での検査法にも利用できることをめざす。

## B. 研究方法

### 1. 抗プリオンペプチド抗体の作製と抗体の性質の解析

ウシ、ヒ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 HSA または BSA に結合させたものを免疫抗原とした。それらをウサギ (NZW) およびニワトリ (白色レグホン) に免疫した。また、抗原をマウス (Balb/c) に免疫した後、ハイブリドーマを作製した。得られた抗血清およびハイブリドーマ培養上清の抗体価を、ペプチド-OVA を固相抗原にして ELISA で測定した。さらに、得られた抗体を 1 次抗体として、ウシ脳 P2 画分を試料としたイムノブロッティングを行った。HRP 標識 2 次抗体を用いる発色法で検出した。

### 2. 医薬品・化粧品関連原材料中の微量汚染プリオンの沈殿濃縮方法の開発

スクレイビー感染マウス脳抽出物を添加した、市販のコラーゲン及びゼラチンをモデル試料とした。コラーゲンおよびゼラチンの粘度を低下させるために、Proteinase K, bromelain 及び collagenase の処理温度、処理時間、溶液の pH 等に関して検討した。粘度の低下した材料から PrP<sup>Sc</sup> を選択的に沈殿濃縮する方法として、アルコール沈殿、硫酸沈殿及びポリエチレングリコール沈殿を検討した。PrP<sup>Sc</sup> の検出にはウエスタンブロット法を用いた。

### 3. 培養細胞での正常プリオンタンパクの発現制御の解析

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G を培養後に破碎し、遠心分離(100,000 g, 60 分間)で沈殿した膜画分を溶解して SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。抗ヒト・プリオン抗体(3F4)を用いたイムノブロッティングを行い、化学発光法でプリオンタンパクを検出した。

## C. 研究結果

### 1. 抗プリオンペプチド抗体の作製と抗体の性質の解析

ウシプリオンタンパク (PrP) の免疫化学的検出法の高感度化のための、高親和性抗体の作製を目的として、ウサギとニワトリによるポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、ウシの PrP の N 端側付近のペプチド B104-123 を抗原として作製したウサギ抗血清、および、ヒト PrP の N 端側付近のペプチド H95-114 を抗原として作製したウサギ抗血清が、

共に、ウシ脳由来の正常プリオンタンパク (PrP<sup>C</sup>) のイムノブロッティングに使用できることを確認した。一方、ニワトリ抗血清は、ウシ脳由来の PrP<sup>C</sup> に対するイムノブロッティングに使用できるものが得られなかった。また、ウシ PrP の N 端側付近および C の端側付近のペプチドに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得られたので、現在、腹水化と抗体の性質の解析を行っている。

今年度は、ウシ 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。PrP<sup>C</sup> のイムノブロッティ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<sup>C</sup> 及び変性させた PrP<sup>Sc</sup> を認識できると推測される。

### 2. 医薬品・化粧品関連原材料中の微量汚染プリオンの沈殿濃縮方法の開発

bromelain 消化、及びコラーゲン溶液の pH を中性に調整後に collagenase 消化する方法が粘性の低下と共に、後の PrP<sup>Sc</sup> 沈殿の際に夾雑蛋白質量を低下させる上で適していた。酵素処理により粘性の低下した溶液から、PrP<sup>Sc</sup> を定量的に沈殿させ、かつ総蛋白質量を可能な限り減少させるためには、1% NaCl 存在下で 8% ポリエチレングリコールによる沈殿が優れていた。5 ml のコラーゲン溶液からの添加 PrP<sup>Sc</sup> の回収率は 40~50%、50 ml からは 30% 程度であった。ゼラチンも同一プロトコルで処理できた。

コラーゲナーゼによる PrP<sup>Sc</sup> の減少は認められず、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、PrP<sup>Sc</sup> は 90% 以上回収された。しかし、最終的な回収率が 30~50% と予想外に低かった。この理由は、10 ml~50 ml の遠心管から沈殿を定量的に微量遠心管に移す際のロスと、混在する可能性のある PrP<sup>C</sup> を除去するための Proteinase K 処理により PrP<sup>Sc</sup> の一部も部分分解したためと推定された。これらのことから、なお試料調製法の改良が必要と考えられる。

### 3. 培養細胞での正常プリオンタンパクの発現制御の解析

各種のヒト培養細胞株から調製した膜画分のイムノブロッティングを行った結果、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G に、抗ヒト・プリオン抗体が認識する数本のバンドを検出した。糖鎖の合成を阻害するツニカマイシンで T98G 細胞を処理しても、また、N-グリコシド結合を切断する N-グリコナーゼで膜画分を酵素処理しても、高分子量の 2 本のバンドが消失して低分子量のバンドが増大した。従って、T98G 細胞は糖鎖が結合した PrP<sup>C</sup> を産生する事が確認された。

培養開始 4 日後の対数増殖期の T98G 細胞から

得た膜画分では PrP<sup>C</sup> の含量は低く、8 日から 16 日後の定常期の膜画分では PrP<sup>C</sup> の含量が増大した。また、異なった細胞密度で一定時間培養した細胞から得た膜画分では、接触阻止のかかった細胞では PrP<sup>C</sup> の含量は高く、細胞密度が低い細胞では含量が低かった。さらに、培養細胞から放出される autocrine factor の関与を調べるため、接触阻止がかからない細胞密度の細胞に T98G 細胞の培養上清を添加して培養し、膜画分のイムノブロッティングを行った。培養上清の存在下で培養した細胞から調製した膜画分の PrP<sup>C</sup> の含量は、新鮮な培地で培養した細胞から得た膜画分と有意差がなかった。以上の結果から、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G での PrP<sup>C</sup> の発現は、その産生する autocrine factor ではなく、細胞密度に依存して制御されていることが示唆された。

#### 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、医薬品等原材料に混入した極微量のプリオンタンパクを検出するためには、試料の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。そのために、まず、新たな抗 PrP 抗体の作製を試みた結果、今年度は、ウシ 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。得られた抗血清と既存の抗 PrP 抗体を用いて、次年度に高感度 ELISA の検討を行う予定である。また、医薬品・化粧品関連原材料として汎用されるコラーゲンやゼラチンをモデル試料にして、マウススクレイピープリオンをスパイクして、これを効率良く回収し検出する方法を検討した。その結果、粘稠性が高い試料の前処理に、bromelain 及び collagenase が有効であり、酵素処理試料から PrP<sup>Sc</sup> を濃縮するためにはポリエチレングリコール沈殿が有効であった。次年度は、PrP<sup>Sc</sup> の回収率を高めるために、試料調製法にさらに改良を加える。今後、抗体作製とプリオン濃縮法の研究成果を組み合わせることによって、ELISA の高感度化が図れると期待される。

プリオンタンパクは中枢神経系、特に脳で大量に発現していることが知られているが、現状では正常ヒト・プリオンタンパクの供給源として人の脳を用いることは難しい。遺伝子工学の手法を用い、大腸菌で発現させた糖鎖のないプリオンタンパクを調製することは可能である。しかし、プリオンタンパクの糖鎖の有無がその異常化に関与しているとの報告があり、糖鎖を有する正常ヒト・プリオンタンパクの確保が望まれている。今回、ヒトグリオーマ T98G 細胞がヒト正常プリオンタンパクを多量に定常的に発現していることを見出した。T98G 細胞は付着細胞として増殖し、培養

も容易なことから、正常ヒト・プリオンタンパク質の供給源として有望である。また、今後この細胞株を用いて、プリオンタンパクに関連する細胞内反応を解析し、異常プリオンタンパクに対して敏感に変化する細胞内反応を探索する。その成果を基に、BSE 病原体の *in vitro* バイオアッセイ法の開発をめざす。

#### E. 結論

1. 抗ウシプリオンタンパク抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）を作製し、その反応特性を解析した。その結果、ウシプリオンタンパクのイムノブロッティングに利用可能なポリクローナル抗体が得られた。
2. 医薬品・化粧品関連原材料として汎用されるコラーゲンおよびゼラチン中の汚染プリオンを検出するための試料処理法の検討し、酵素処理（プロメリン、コラゲナーゼ）とポリエチレングリコール沈殿によってプリオン PrP<sup>Sc</sup> を抽出することができた。
3. 正常プリオンタンパクを発現しているヒト培養細胞株 T98G を見出し、その細胞におけるプリオンタンパクの発現量と培養条件との関連を解析した。その結果、プリオンタンパクの発現量が細胞密度に依存することを見出した。

#### 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).

2. 学会発表

- 1) 菊池裕、山崎壮、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. Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology, Infections of the nervous system: host-pathogen interactions, March, 1999, New Mexico, USA.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

動物組織由来医薬品等原材料の異常プリオンタンパク汚染の高感度検出法の開発  
ーウシプリオンタンパクの高感度免疫アッセイ法の開発ー

主任研究者 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

ウシプリオンタンパク（PrP）の免疫化学的検出法の高感度化のための、高親和性抗体の作製を目的として、ウサギとニワトリによるポリクローナル抗体およびマウスモノ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が、ウシ脳由来の正常プリオンタンパクの免疫ブロットティングに使用できることを確認した。また、ウシPrPのN端側付近およびCの端側付近のペプチドに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得られたので、現在、腹水化と抗体の性質の解析を行っている。

A. 研究目的

伝達性海綿状脳症（プリオン病）の原因物質である異常プリオンタンパクの、食品、医薬品、医療材料、およびそれらの原材料への混入が、国際的問題になっている。我が国でも、輸入されたヒト硬膜を介してプリオン病患者が発生している。医薬品、医薬部外品、化粧品にはウシ由来成分が多数含まれている。幸いに、医薬品等中に含まれるウシ由来成分からウシ伝達性海綿状脳症（BSE）が伝達したと考えられる症例は報告されていないが、今後外国産原材料から感染事故が起こる可能性は否定できない。病原性プリオン感染を防ぐためには、医薬品、医療材料等の異常プリオンタンパクによる汚染の有無を確認し、プリオンの混入を排除することが有効である。異常プリオンタンパクの検出法としては、バイオアッセイ法が高感度であるが、迅速性、簡便性に欠ける。医薬品等原材料に混入した微量の異常プリオンタンパクの検出法には、現在のバイオアッセイ法のみでは不十分であり、免疫化学的手法を利用する高感度検出法の開発が望まれている。

そこで、本研究では、医薬品等原材料中へのBSE病原体の汚染を想定して、その高感度検出法の開発を行う。我々は、免疫化学的検出法の一層の高感度化のための、高親和性抗体の作製と高感度ELISAの開発に関する研究を分担する。

B. 研究方法

1. 抗プリオンペプチド抗体の作製

ウシ、ヒトのプリオンタンパクのN端側およびC端側付近のペプチドを、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。

抗原#1:

Bovine PrP(104-123)-Cys-HAS

[ペプチドのアミノ酸配列は、

GGTHGQWNKPSKPKTNMKHVC] (BPNと略す)

抗原#2:

HSA-bovine PrP(225-241)

[CITQYQRESQAYYQRGA] (BPCと略す)

抗原#3:

BSA-Cys-human PrP(95-114)

[CTHSQWNKPSKPKTNMKHMAG] (HPNと略す)

抗原#4:

BSA-human PrP(214-230)

[CITQYERESQAYYQRGS] (HPCと略す)

抗原#1~#4をウサギ(NZW)に6回免疫した。また、抗原#2と#4をニワトリ(白色レグホン)に5回免疫した。得られた抗血清の抗体価は、ペプチド-OVAを固相抗原にしてELISAで測定した。

抗原#1、#2をマウス(Balb/c)に6回免疫した後、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマ培養上清の抗体価を測定した。

2. イムブロットティング

ウシ脳P2画分を試料としてSDS-PAGE

(±2ME)を行った後、イムブロットティングを行った。1次抗体として、ウサギ抗血清、ニワトリ抗血清、マウスハイブリドーマの培養上清、マウスモノクローナル抗体BSPX-54(抗ウシPrP、抗原ペプチドはBovine PrP(146-159)、帯広畜産大学の堀内基広博士、品川森一博士より分与)を用いた。HRP標識2次抗体を用いる発色法で検出した。

## C. 研究結果

### 1. 抗プリオンペプチド抗体の作製

#### 1. 1. ポリクローナル抗体

ウシ、ヒトの各 PrP の N 端側および C 端付近のペプチドを抗原として、ウサギとニワトリの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、これら抗血清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 (BPN) を抗原として作製したウサギ抗ウシプリオンペプチド抗血清 (ウサギ抗 BPN 抗血清) が、ウシ脳由来の PrP<sup>C</sup> に反応することがわかった。また、ヒト PrP の N 端側付近のペプチド (HPN) を抗原として作製したウサギ抗ヒトプリオンペプチド抗血清 (ウサギ抗 HPN 抗血清) も、ウシ脳由来の PrP<sup>C</sup> に反応することがわかった。なお、両方の抗血清ともに、ウシ脳 P2 画分の SDS-PAGE を 2-メルカプトエタノール (2ME) 存在下で行った場合よりも 2ME 非存在下で行った場合のほうが、イムノブロッティングでの PrP<sup>C</sup> に対する反応性がよかった。

今回の抗血清作製で、ウシ脳由来の PrP<sup>C</sup> に反応するウサギ抗血清を得ることができた。

一方、ニワトリ抗血清は、ウシ脳由来の PrP<sup>C</sup> に対するイムノブロッティングに使用できるものが得られなかった。

#### 1. 2. モノクローナル抗体

ウシ PrP の N 端側付近および C 端側付近のペプチド (それぞれ BPN、BPC) に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。ペプチド-OVA を固相抗原にした ELISA で測定した結果、抗 BPN 抗体活性をもつ 1 クローンと、抗 BPC 抗体活性をもつ 2 クローンが得られた。現在、ハイブリドーマの腹水化とイムノブロッティングによる抗体の反応性の解析を進めている。

## 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、医薬品等原材料に混入した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。そのために、新たな抗体の作製を試みた。今年度は、ウシ PrP に対するウサギ抗血清を得ることができた。PrP<sup>C</sup> のイムノブロッティ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<sup>C</sup> 及び変性させた PrP<sup>Sc</sup> を認識できると推測される。また、ウシ脳 P2 画分の SDS-PAGE を 2ME 非存在下で行った場合にイムノブロッティングでの PrP<sup>C</sup> に対する反応性が

よかったことから、免疫沈降物の SDS-PAGE (2ME 非存在下) 後のイムノブロッティングにこの抗血清が利用できると思われる。試料中の極微量プリオンの特異的抽出法として免疫沈降法を用いることも今後検討したい。

次年度は、今年度得られた抗血清および既存の抗 PrP 抗体を用いて高感度 ELISA の検討を行う。また、新たなペプチドを用いて、ウシ PrP の C 端側付近のペプチドに対する抗血清の作製を試みる。

## E. 結論

平成 10 年度は、ウシプリオンタンパクの免疫化学的検出法の高感度化のための高親和性抗体の作製を目的として、ウサギとニワトリによるポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、ウシ脳由来の PrP<sup>C</sup> に反応するウサギ抗血清を得ることができた。また、ウシ PrP ペプチドに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得られたので、腹水化と抗体の性質の解析を現在進めている。

## F. 研究発表

### 学会発表

1. 菊池裕、山崎壮、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.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

動物組織由来医薬品等原材料の異常プリオンタンパク汚染の高感度検出法の開発  
—家畜由来の医薬品・化粧品関連原材料を汚染するプリオン検出のための試料調整法の開発—

分担研究者 品川森一 帯広畜産大学畜産学部 獣医公衆衛生学 教授

研究要旨

コラーゲン及びゼラチンにマウススクレイピープリオンをスパイクして、これを効率良く回収し検出する方法を検討した。粘稠性が高い試料の前処理に、bromelain 及び collagenase が有効であり、酵素処理試料から PrP<sup>Sc</sup> を濃縮するため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、添加プリオンの 30～50% が最終試料に回収されることがわかった。このことは試料調製法としてなお改善の余地があること示している。

A. 研究目的

医薬品・化粧品関連原材料として汎用されるコラーゲンやゼラチン等の動物由来物質がプリオン汚染される危険性がある。しかしこれらの汚染プリオンを検出する方法が確立されていない。本研究ではプリオンの構成蛋白である異常型プリオン蛋白、PrP<sup>Sc</sup> を免疫学的に検出してプリオン汚染を検知するための試料調製法を検討することを目的とした。

B. 方法

スクレイピー感染マウス脳抽出物を添加した、市販のコラーゲン及びゼラチンを出発材料とした。コラーゲンおよびゼラチンの粘稠性を低下させるために、Proteinase K, bromelain 及び collagenase の処理温度、処理時間、溶液の pH 等に関して検討した。粘稠性の低下した材料から PrP<sup>Sc</sup> を選択的に沈殿濃縮する方法として、アルコール沈殿、硫酸沈殿及びポリエチレングリコール沈殿を検討した。PrP<sup>Sc</sup> の検出にはウエスタンブロット法を用いた。

C. 結果

bromelain 消化、及びコラーゲン溶液の pH を中性に調整後に collagenase 消化する方法が、粘稠性の低下と共に、後の PrP<sup>Sc</sup> 沈殿の際に夾雑蛋白量を低下させる上で適していた。酵素処理により粘稠性の低下した溶液から、PrP<sup>Sc</sup> を定量的に沈殿させ、かつ総蛋白量を可能なかぎり減少させるためには、1% NaCl 存在下で 8% ポリエチレングリコールによる沈殿が優れていた。5 ml のコラーゲン溶液からの添加 PrP<sup>Sc</sup> の回収率は 40～50%、50 ml からは 30% 程度であった。ゼラチンも同一プロトコールで処理できた。

D. 考察

コラーゲナーゼによる PrP<sup>Sc</sup> の減少は認められず、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、PrP<sup>Sc</sup> は 90% 以上回収された。しかし、最終的な回収率が 30～50% と予想外に低かった。この理由は、10 ml～50 ml の遠心管から沈殿を定量的に微量遠心管に移す際のロスと、混在する可能性のある PrP<sup>C</sup> を除去するための Proteinase K 処理にあると推定された。これらのことから、なお試料調製法の改良が必要と考えられる。

E. 結論

bromelain 及び collagenase 処理によりコラーゲンの粘稠性低下が可能であった。PrP<sup>Sc</sup> 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。PrP<sup>Sc</sup> の回収率からなお試料調製法の改良が必要と考えられる。

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).

動物組織由来医薬品等原材料の異常プリオンタンパク汚染の高感度検出法の開発  
—プリオンタンパクの細胞培養系による *in vitro* バイオアッセイ法の開発—

分担研究者 菊池裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部主任研究官

研究要旨

プリオン病は正常プリオンタンパク質が異常プリオンタンパク質に変化して発症することが知られ、異常プリオンタンパク質の発症における役割に関する研究が精力的に進められている。しかし、正常プリオンタンパク質の生体内における機能は未だに解明されていない。そこで、正常プリオンタンパク質の生理作用の解明を目的とし、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G のプリオンタンパク質の発現機構を調べた。T98G 細胞の遠心分離（100,000 g, 60 分間）で得られる GPI-アンカー型タンパク質が含まれる膜画分に、抗ヒト・プリオン抗体が認識する数本のバンドが検出された。ツニカマイシンで T98G 細胞を処理すると、高分子量の 2 本のバンドが消失して低分子量のバンドが増大したことから、この 3 本のバンドはプリオンタンパク質と考えられた。培養開始 4 日後の対数増殖期の T98G 細胞から得た膜画分ではプリオンタンパク質の含量は低く、8 日から 16 日後の定常期の膜画分ではプリオンタンパク質の含量が増大した。また、一定の培養時間で異なった細胞密度で培養した細胞から得た膜画分では、接触阻止のかかった細胞ではプリオンタンパク質の含量は高く、細胞密度が低い細胞では含量が低かった。以上の結果から、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G のプリオンタンパク質の発現は、その細胞密度に依存することが示唆された。

A. 研究目的

プリオン病と総称されている伝達性海綿状脳症は、神経が脱落して脳がスポンジ状になる病気で、ヒトの遺伝病であるクロイツフェルト・ヤコブ病やクールー病、ヒツジ・スクレイビー、ウシ海綿状脳症（狂牛病）等が知られている。プリオン病は正常プリオンタンパク質が異常プリオンタンパク質に変化して発症する事から、動物実験等による異常プリオンタンパク質の研究が精力的に行われている。一方で正常プリオンタンパク質の消失がプリオン病の一因になっている可能性の指摘があるが、未だにその生体内での機能は解明されていない。

正常プリオンタンパク質は 2 本の糖鎖を有する分子量が 30,000-35,000 の糖蛋白質で、glycosylphosphatidylinositol (GPI) で細胞膜に結合している GPI アンカー型タンパク質である。一般に GPI アンカー型タンパク質は細胞膜上での高い流動性を有し、他の情報伝達に関与する分子との会合により機能を発現する例や、抗体刺激によるカベオラへの集積等が報告されている。正常プリオンタンパク質は様々な臓器で発現しており、特に中枢神経系での発現量が高いことが知られ、ニューロンでの発現が最も高く、次いでグリア細胞に多く見られる。プリオン病では脳のニューロンの脱落による海綿状変性と共に、アストロサイトのグリオーシスが認められている。

本研究では免疫原や標準品としての正常ヒト・プリオンタンパク質の確保を目的とし、抗ヒト・

プリオン抗体を用いてヒト培養細胞株の細胞膜画分を対象にしたイムノプロット法によるスクリーニングを行った。

B. 研究方法

ヒト細胞株を培養後に破碎し、遠心分離（100,000 g, 60 分間）で沈殿した膜画分を溶解して SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。抗ヒト・プリオン抗体（3F4）を用いたイムノプロットを行い、化学発光法でプリオンタンパク質を検出した。

C. 研究結果

ヒト培養細胞株から調製した膜画分のイムノプロットを行ったところ、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G の GPI-アンカー型タンパク質が含まれる膜画分に、抗ヒト・プリオン抗体が認識する数本のバンドを検出した。糖鎖の合成を阻害するツニカマイシンで T98G 細胞を処理すると、高分子量の 2 本のバンドが消失して低分子量のバンドが増大した。同様に N-グリコシド結合を切断する N-グリカナーゼ（PNGase F）で膜画分を酵素処理すると、抗体が認識するバンドは低分子量のバンドに集約された。以上の結果から、抗体の認識するタンパク質をプリオンタンパク質と推定した。

培養開始 4 日後の対数増殖期の T98G 細胞から得た膜画分ではプリオンタンパク質の含量は低く、8 日から 16 日後の定常期の膜画分ではプリオンタンパク質の含量が増大した。また、一定の培養時

間で異なった細胞密度で培養した細胞から得た膜画分では、接触阻止のかかった細胞ではプリオンタンパク質の含量は高く、細胞密度が低い細胞では含量が低かった。

培養細胞から放出される autocrine factor の関与を調べるため、4日間培養した培養上清を培地に添加して接触阻止がかからない細胞密度で培養し、膜画分のイムプロットングを行った。しかし、培養上清の存在下で培養した細胞から調製した膜画分のプリオンタンパク質の含量は、新鮮な培地で培養した細胞から得た膜画分と有意差がなかった。

#### D. 考察

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G の膜画分に、イムプロット法により正常プリオンタンパク質を検出した。ツニカマイシンを用いた培養、及び膜画分の N-グリカナーゼ処理により、T98G 細胞は糖鎖が結合した正常プリオンタンパク質を産生する事が確認された。

プリオンタンパク質は中枢神経系、特に脳で大量に発現していることが知られているが、現状では正常ヒト・プリオンタンパク質の供給源として人の脳を用いることは難しい。従って遺伝子工学の手法を用い、大腸菌で発現させた糖鎖のないタンパク質としての調製が試みられ、その立体構造の研究などに用いられている。しかし、プリオンタンパク質の糖鎖の有無がその異常化に関与しているとの報告があり、糖鎖を有する正常ヒト・プリオンタンパク質の確保が望まれている。T98G 細胞は付着細胞として増殖し、細胞培養用の dish での培養が比較的容易な事から、正常ヒト・プリオンタンパク質の供給源として有望である。

T98G 細胞の膜画分におけるプリオンタンパク質の発現は、その細胞密度に依存し、接触阻止がかかった状態での培養で高発現することが確認された。また、T98G 細胞の培養上清は、膜画分のプリオンタンパク質の発現を誘導しなかった。以上の結果から、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G でのプリオンタンパク質の発現は、その産生する autocrine factor ではなく、細胞密度に依存することが示唆された。

#### E. 結論

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G の膜画分に、糖鎖を有する正常ヒト・プリオンタンパク質を検出した。プリオンタンパク質の発現は細胞密度が低い条件下では低く、接触阻止がかかった条件下で高い発現量を示した。また、培養細胞から放出される autocrine factor ではプリオンタンパク質の発現は増加しなかった。以上の結果から、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G のプリオンタンパク質の発現

は、細胞密度に依存することが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

1. 菊池裕、山崎壮、高鳥浩介、澤田純一、正常プリオンタンパク質のヒト・グリオーマ細胞における発現機構、第 71 回日本生化学大会、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, Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology, Infections of Nervous System: Host-Pathogen Interactions, March, 1999, New Mexico, USA