

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11年度 研究報告書  
総合研究報告書

平成12年3月

主任研究者 品川 森一  
帯広畜産大学獣医公衆衛生学

# 目 次

## 1. 平成11年度報告書

### 1) 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：品川 森一（帯広畜産大学獣医公衆衛生学）

### 分担研究報告書

#### 2) スクレイパ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抗体及び脊髄液を用いた生体診断系の開発

分担研究者：高橋 秀宗（国立感染症研究所感染病理部）

#### 4) スクレイパ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) 食品中の微量プリオン蛋白の濃縮法の開発

分担研究者：澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所）

#### 6) 血液製剤を対象とした高感度検出系の開発

分担研究者：岡田 義昭（国立感染症研究所細菌血液製剤部）

#### 7) トランスジェニックマウスを用いたバイオアッセイ法の開発

分担研究者：北本 哲之（東北大学医学部）

#### 8) トランスジェニックマウスを用いたバイオアッセイ法の開発

分担研究者：小野寺 節（東京大学農学部）

## 2. 総合研究報告書

### 1) 総合研究報告書

主任研究者：品川 森一（帯広畜産大学獣医公衆衛生学）

### 分担研究報告書

2) 主任研究者：品川 森一（帯広畜産大学獣医公衆衛生学）

3) 分担研究者：高橋 秀宗（国立感染症研究所感染病理部）

4) 分担研究者：神山 恒夫（国立感染症研究所獣医科学部）

5) 分担研究者：澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所）

6) 分担研究者：岡田 義昭（国立感染症研究所細菌血液製剤部）

7) 分担研究者：北本 哲之（東北大学医学部）

8) 分担研究者：小野寺 節（東京大学農学部）

## 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 教授

### 研究要旨

金属塩によるプリオン沈殿は、特異性が低かった。PrPScを抗原抗体反応が可能な条件で溶解することは困難であったが、変性後、リン脂質存在下でサルコシル溶解を行と免疫沈降を行うことができ、抗体を用いたPrPScの濃縮法が可能となった。抗体でコートした磁気ビーズ・ビオチン標識抗体の組み合わせた検出法は、部分精製試料では有効であったが組織抽出物では反応阻害があり実用に至っていない。一方、CJDでは髄液中に漏出する14-3-3蛋白を検出するために、特異的なサブタイプを認識するモノクローナル抗体を作成し、エスタンプロット等で髄液を対象としたCJDの補助診断が可能となった。スクレイピー感染マウスの系で、脾臓と同様に早期から末梢白血球からPrPScが検出された。慎重に追試・確認をする必要があるが、事実とすれば、末梢血を用いたスクレイピーの早期診断が可能となる重要な成果と言える。

人・マウスキメラPrP遺伝子をノックアウトマウスに導入したものは、発現量の高いものは潜伏期が長く、ほぼ野生型と同量発現しているものが最適であった。白オリックスPrP遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、導入PrP遺伝子だけを発現するマウスが完成し、繁殖が可能となった。羊型及び牛型Tgマウスは羊スクレイピーの潜伏期が短縮されず、有効ではないことが判った。

### 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日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) PrPScの免疫生化学的検出

プリオン材料は主としてプリオン感染マウス組織を用い、各種正常動物組織材料にスパイクしたものあるいは正常組織を出発材料とした。緩衝液に各種界面活性剤、酵素等を加えて組織乳剤・抽出物を作成した。研究目的に合わせて各種処理・操作を加えた。各種PrPSc・PrPC検出を用いても、最終的にウエスタンプロットで確認した。

#### 2) バイオアッセイ

ヒトCJD脳乳剤あるいは羊スクレイピー脳乳剤を20-30mlづつ、被験マウスに脳内接種した。発症マウスの脳は組織学的、免疫組織学的、免疫生化学的に解析した。

動物実験は必要最小限に止め、各研究組織の実験動物委員会あるいは相当委員会の動物の指針に従い動物実験を行った。動物に苦痛を与えないために、接種あるいは淘汰は麻酔下に行った。

### C. 研究結果

#### 1. プリオン蛋白、PrPScの高感度検出

##### PrPSc検出用試料の調整とPrPScの検出系

微量プリオンのPrPScを検出するため、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。一段階で濃縮するために、11種の金属塩による沈殿を調べたが、非特異的に蛋白沈殿が起きるため実用的なものはない。抗体結合磁気ビーズ

による方法PrPScの捕捉とビオチン化抗体による検出系を開発した。部分精製した試料では有効であったが、目的とする組織溶解物では界面活性剤、使用酵素による反応阻害が認められ、改善が必要であった。PrPScを含む粗沈殿を一旦変性剤で変性させ、アルコール沈殿後にリン脂質存在下で0.2%サルコシル溶解を行うと免疫沈降にも有効であった。

従来のウエスタンブロット法によりスクレイプ一感染マウスの抹消白血球からPrPScが検出された。重要な知見のため、追試・再確認が必要である。

## 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マウス

ヒト・マウスキメラPrP発現PrPのノックアウトマウスはヒト・プリオンに対して高感受性であった。このマウスをさらに解析した結果、キメラ遺伝子を高発現するものはかえって潜伏期が長くなり、野生型と同程度に発現するものが一番潜伏期が短く、高感受性マウスであることが判った。

### 2) 羊型のトランスジェニック・マウス

羊・マウスキメラPrPおよび牛・マウスキメラPrPの発現が確認されたトランスジェニック・マウスの羊スクレピープリオンに対する感受性を感染試験を行った。ヒト型と違い、残念ながら、羊型は野生型とほぼ同じの400台の潜伏期、牛型はさらに潜伏期が延長した。羊型マウスの発症個体に蓄積したPrPScの極く一部が導入遺伝子由来のPrPScであった。この結果これらのマウスは有用なバイオアッセイ系として使用できないことが判った。ノックアウトマウスに発現させたものの感受性を調べている。

オリックス型トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスに導入したものが、交配出来る段階までに用意された。感染実験を準備している。

## D. 考察

PrPSc検出のための試料調整法は、対象が多様なため個々に対応する必要がある、さらに対象に合った改良を絶えず持続する必要がある。プリオンの選択的濃縮のために重金属塩による沈殿法を11種の塩について検討したが、前年度報告した食塩存在下のポリエチレングリコール沈殿に勝るものは無かった。プリオンは緩衝液には難溶性のため、グアニジン塩或SDSが溶解に用いられる。これらの存在下では抗原抗体反応が阻害される。今回このように溶解したPrPScを沈殿させると、リン脂質存在下で低濃度のサルコシルで再溶解可能で、さらに免疫沈降が実施できた。この方法は、免疫学的な濃縮及び直接検出法に応用可能である。抗体結合磁気ビーズを用

いてPrPScを捕捉し、ビオチン化抗体で検出する、遠心操作を省いた方法も、試料調整が完全には完成していない。低速遠心の操作を加える必要があるかもしれない。動物組織からの試料調整法に比べ、血液、血清製剤を対象として試料調整法が進まず、多に反省すべき点である。

14-3-3蛋白検出用のモノクローナル抗体が用意できた。本抗体によりCDJと他の疾患の類症鑑別がどこまで可能か、今後の課題である。

ノックアウトマウスにヒト・マウスキメラPrPを導入した実験動物が完成したため、ヒト型バイオアッセイ系は完成したと言える。しかし、それでも発症まで100日台の期間を必要とするため、バイオアッセイによる診断を迅速化するために、潜伏期の動物の細網リンパ系組織から免疫組織化学あるいは免疫生化学的なPrPSc検出を組み合わせることを検討することが今後の課題であろう。

ヒト型と同様は手法で作成した動物型トランスジェニックマウスは、実用的でなかった。ノックアウトマウスに導入したマウスの成績がまたれる。また、未だ試験されていない、オリックス型の感染試験も早急に実施する必要がある。

## E. 結論

金属塩をプリオンの選択沈殿に使用するためには更なる条件の検討が必要である。開発された磁気ビーズ法は試料調整の改良が必要であり、完成したとは言い難い。プリオンを含む沈殿の抗原抗体反応可能な溶解法が開発された。14-3-3蛋白のサブタイプを認識できるモノクローナル抗体が作成された。

作成されたヒト型マウスはバイオアッセイ系として有用であった。しかし、動物型は有用ではなかった。オリックス型のマウスが完成した。

## F. 研究発表

Takahashi, H., Takahashi, R.H., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T. and Nagashima, K. Characterization of antibodies raised against bivariate-PrP-peptides. *J Neurovirol* 5: 300-307, 1999

Nemoto, T, Horiuchi, M, Ishiguro, N, Shinagawa, M. Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch Virol* 143:1-8, 1999

品川森一 動物のプリオン病, 宮城獣医師会会報

- 52:121-131, 1999.
- Laplanche, J-L, Hunter, N, Shinagawa, M, Williams, E. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. pp393-429. In S B Prusiner (ed), Prion Biology and Diseases, Monograph 38, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1999
- Takahashi, H, Iwata, T, Kitagawa, Y, Takahashi, RH, Sato, Y, Wakabayashi, H, Kido, H, Nagashima, K, Kenney, K, Gibbs CJr, and Kurata, T. Increased levels of e and g isoform 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Clin Diagn Lab Immunol 6: 983-985, 1999
- Nagashima, T, Okawa, M, Kitamoto, T, Takahashi, H, Ishihara, Y, Ozaki, Y, and Nagashima, K. Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic alcoholic. J Neurol Sci 163:192-198, 1999
- Matsuda, H, Mitsuda, H, Nakamura, N, Furusawa, S, Mohri, S, and Kitamoto, T. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. FEMS Immunol Med Microbiol 23: 189-194, 1999.
- Shimizu, S, Hoshi, K, Muramoto, T, Homma, M, Ironside, JW, Kuruhara, S, Sato, T, Yamamoto, T, Kitamoto, T. Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques after cadaveric dural grafting. Arch Neurol 56A:357-362, 1999.
- Yamada, H, Ito, Y, Inaba, A, Wada, Y, Takashima, M, Satoh, S, Kamata, T, Okeda, R, Kayano, T, Suematsu, N, Kitamoto, T, Otome, E, Matsushita, M, and Mizusawa, H. An inherited prion disease with PrP P105L mutation: clinicopathological and PrP heterogeneity. Neurology 53:181-188, 1999.
- Hainfellner, JA, Parchi, P, Kitamoto, T, Jarius, C, Gambetti, P, and Budka, H. A novel phenotype in familial Creutzfeldt-Jakob disease: Prion protein gene E200K mutation coupled with valine at codon 129 and type 2 proteinase-resistant prion protein. Ann Neurol 45:812-816, 1999.
- Murayama, J, Shin, R-W, Higuchi, J, Shibuya, S, Muramoto, T, and Kitamoto, T. Interaction of Aluminum with PHFt in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method. Am J Pathol 155:877-885, 1999.
- Yamazaki, M, Oyanagi, K, Mori, O, Ohyama, M, Terashi, A, Kitamoto, T, and Katayama, Y. Variant Gerstmann-Straussler syndrome with the P105 prion protein gene mutation: and unusual case with nigral degeneration and widespread neurofibrillary tangles. Acta Neuropathol 98:506-511, 1999.
- Mizoi, S, Yoshino, T, Momotani, E, Kubosaki, A, Nakamura, Y, and Onodera, T. Exacerbated spongiform lesions in cerebral cortex of scrapie in Japanese sheep in putbreak during 1984-1987. Jpn J Inf Dis 52: 242-226, 1999.
- Kuwahara, C, Takeuchi, AM, Nishimura, T, Haraguchi, K, Kubosaki, A, Matsumoto, Y, Saeki, K, Matsumoto, Y, Yokoyama, T, Itohara, S, and Onodera, T. Prion prevent neuronal cell-line death. Nature 400:225-226, 1999.
- Yusa, S, Ohnishi, M, Naito, M, Yamamoto, S, Ishihara, H, Hirokami, Y, Onodera, T, and Miyazaki, T. AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF- $\beta$ 1. Eur J Immunol 29:1086-1093, 1999.
- Kuwahara, C, Kubosaki, A, Nishimura, T, Nasu, Y, Saeki, K, Matsumoto, Y, and Onodera, T. Enhanced expression of cellular prion protein gene by insullin. Biochem Biophys Res Comm 213 : (in press).

## 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 堀内基広 帯広畜産大学畜産学部 獣医公衆衛生学・

原虫病分子免疫研究センター

石黒直隆 帯広畜産大学畜産学部 獣医公衆衛生学

高橋未緒 帯広畜産大学畜産学部 獣医公衆衛生学

#### 研究要旨

1) 金属化合物によるプリオンの選択的沈殿を検討した。検討した11種の金属塩の内、硫酸ニッケルガヤや有望である以外、プリオンが沈殿する条件では共存蛋白が非常に多量に沈殿し、以前に検討してポリエチレングリコール沈殿に勝る成績は得られなかった。2) 抗プリオン抗体でコートした磁気ビーズとビオチン標識抗プリオン抗体を用い、全く遠心操作を省いた検出系の開発を行っている。部分精製した試料では十分使用可能であるが、生体組織から調整した粗抽出物を対象とした場合、界面活性剤、使用酵素、組織中の阻害物質等が反応を強く抑制することが判った。本系に適した試料調整法の検討続行している。3) 羊型及び牛型キメラプリオン遺伝子発現トランスジェニックマウス(Tgマウス)の羊スクレイピープリオンに対する感受性試験を行った。予想に反して、羊型の感受性は変わらず、牛型ではかえって低下していた。

#### 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、PrP<sup>Sc</sup>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、PrP<sup>Sc</sup>高感度検出法を開発することを目的とする。また、高感度バイオアッセイ法開発のアッセイ部分を担当する。

#### B. 方法

金属塩によるプリオン沈殿：硫酸ニッケル、炭酸リチウム、クロム酸カリ、重クロム酸カリ、塩化第1スズ、硫酸銅、酢酸鉛、硫酸マンガン、モリブデン酸アンモニウム、シリコタングステン酸ナトリウム、酢酸ウランの10%または5%液を原液とした。スクレイピーマウス脳乳剤を1.25% Sarkosylを含む1%正常マウス脳乳剤、で0.1%に希釈し、各種金属塩単独あるいは、20mM MgCl<sub>2</sub>存在下に0.5%までの各種に添加した。4℃に放置後、遠心し、沈殿量の比較と、プリオンの回収をウエスタンブロットで判定した。

磁気ビーズ法：ウサギ抗体IgG画分を市販磁気ビーズに結合させたもの、ウサギ抗体IgG画分を

ビオチン化したものを用意した。スクレイピー感染マウス脳乳剤から部分精製したものと及びを正常脳乳剤で希釈したものをPK処理し、被験抗原として使用。磁気ビーズへのプリオンの吸着はSDS溶出後ウエスタンブロットで定量した。系全体を評価する場合はペルオキシダーゼ標識ストربتアビジンを用い発色により測定した。

羊型・牛型Tgマウスの評価：それぞれの遺伝子をへてるにもつマウスと野生型を掛け合わせ、産仔個体に導入遺伝子をヘテロに持つ個体を選び、羊スクレイピー脳乳剤を接種した。羊及び牛PrP特異抗体、マウスPrP特異抗体により、発症したマウスのプリオンの構成を調べた。

動物実験は帯広畜産大学「動物実験委員会」の承認のもとに、指針にしたがって実施した。

#### C. 結果

金属塩によるプリオン沈殿：ニッケル硫酸塩がMgイオンの存在下でもっと夾雑蛋白が少なくプリオンが沈殿した。しかし、ポリエチレングリコール沈殿に比べはるかに夾雑蛋白量が多かった。

磁気ビーズ法：磁気ビーズは部分精製プリオンでは有効に働くが、組織抽出物では遠心操作を

加えないため、使用した界面活性剤および酵素、組織中の阻害物質が磁気ビーズ上の抗体との反応を阻害することが判った。試料調整法の検討を行い、酵素処理が終わった試料を1% Sarkosyl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1M NaCl存在下で100°C30分加熱することで、抗体との反応の阻害を低下させることが判った。引き続き本法を完成させるために検討を行っている。

羊型・牛型Tgマウスの羊スクレイピー実験での有用性の評価：調べた羊型4系統のTgマウスのキメラ遺伝子発現量はマウスPrPの0.3~1倍程度、牛型2系統は0.5~2.3程度であった。スクレイピー羊脳乳剤を接種した野生型マウスの潜伏期は平均425日であり、羊型は450~511日と同程度であり、牛型は最長観察期間526日、最短期間460日で発症していない。羊型に発症した個体のPrPScを調べたところ、使用されているPrPは大部分がマウス由来で極く一部キメラPrPが使用されていることが判った。以上のような成績から、今回作成されたTgマウスはバイオアッセイ用のマウスとしては有効ではないことが判った。PrPノックアウトマウスにキメラ遺伝子を導入したマウスでの接種試験は継続観察中である。

#### D. 考察と結論

金属塩を用いたプリオン沈殿は魅力的な方法と考えられる。しかし、共存する蛋白の共沈を阻止するために、塩類の濃度以外に界面活性剤の種類、濃度等の検討必要であり、まだ実用といえる方法とは言い難いことが判った。現状ではなお、先に報告した、1%NaCl存在下で8%ポリエチレングリコールによる沈殿が実用的といえる。

磁気ビーズを用いたプリオン検出法は、実験室ではなく現場での利用を考慮して遠心操作を省く簡便な方法ということを念頭において検討してきた。その結果、抗原抗体反応の部分的な阻害を除去することが重要課題となった。ある程度試料調整の方法を改変することにより克服できたが、方法が完成したとは言い難い段階である。

羊型及び牛型Tgマウスは残念ながら、人型と異なり、羊スクレイピープリオンの感受性が高くならず、牛型ではかえって抑制的に働くという結果となった。キメラ遺伝子作成の際、PrPのC端部をマウス型に変えている。感受性が増加しなかった原因として、最近、PrPScとの相互作用にC端部も重要という報告があるため、この部位を置き換えてキメラとしたことにあるのかもしれない。

ノックアウトマウスでは、マウスPrPが存在しないため、プリオンのPrPScとの相互作用の際、競合がないため、潜伏期が短縮する可能性もっている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahashi, H., Takahashi, R.H., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T. and Nagashima, K. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J Neurovirol* 5: 300-307, 1999

Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M. Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch Virol* 143:1-8, 1999

品川森一 動物のプリオン病, 宮城獣医師会会報 52:121-131, 1999.

Laplanche, J-L, Hunter, N, Shinagawa, M, Williams, E. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. pp393-429. In S B Prusiner (ed), *Prion Biology and Diseases*, Monograph 38, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1999

##### 2. 学会発表

Shinagawa, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nemoto, T., Takahashi, M., Matsuo, T., Shirafuji, T. and Kaneko, K.: Prion inactivation with liquid ethylene oxide. XIth International Congress of Virology (1999, 8. Sydney)

Shinagawa, M., Horiuchi, M., Grathwohl K.U.D., and Ishiguro, N.: ELISA as a screening method for scrapie-infected animals. *Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man* (1999, 9. Tubingen)

Shinagawa, M., Yamamoto, M., Horiuchi, M., Matsuo, T., Shirafuji, T., Kaneko, K. and Kajihara, Y.: Screening of prion decontaminants. CHI Symposium "Transmissible spongiform encephalopathies" (1999, 10. Washington DC)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（振興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

プリオン病の高感度診断技術の開発

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨

14-3-3蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、ポリクローナル抗体と共にCJD患者脳脊髄液中の14-3-3蛋白を調べたところ、ガンマ及びイプシロン型サブタイプが特異的に上昇していることが判明した。

A. 研究目的

CJDにおいて脊髄液中に異常高値を示す蛋白（14-3-3）の検出法の特異性を高め、生前早期診断系を開発することを目的とした。特にアイソタイプ別の検出に留意し脳脊髄液を解析した。

B. 研究方法

1. 14-3-3蛋白のモノクローナル抗体を4種作成し、サブタイプに対する特異性を検索した。
2. アイソタイプ特異性ポリクローナル抗体を使用してCJD脳脊髄液中の14-3-3蛋白を同様に調べた。

C. 研究結果

1. 得られたモノクローナル抗体によるCJD脳脊髄液の解析により、サブタイプイプシロンが特異的に上昇していることが判明した。
2. ポリクローナル抗体による解析ではCJD脳脊髄液中に増加しているアイソタイプはガンマ及び、イプシロンタイプであることが判明した。
3. モノクローナル抗体及び、ポリクローナル抗体はウエスタンブロットによるディネーチャされた抗原に対して、高い特異性を示したが、ネーティブ抗原に対する特異性は著しく低いことが判明した。

D. 考察

脊髄液を用いた早期診断法として注目される14-3-3蛋白については異なるサブタイプを狙った解析が、より感度と特異性を上昇させると考え、CJD脳脊髄液中のを14-3-3抗原をアイソタイプに分け調べた。その結果、イプシロン型とガンマ型ア

イソタイプが特異的に上昇していることが判明した。一方ネーティブな抗原に対してはモノクローナル抗体及び、ポリクローナル抗体ともに特異性を失っていたため、当初計画していたサンドウィッチELISAによる検出系の開発非常に難しいことが判明した。これは抗原がシャペロン様の活性を有し、結合する抗体に影響を及ぼしている可能性があるためであると考えられた。

E. 結論

14-3-3蛋白に対してサブタイプを認識する抗体を得、イプシロン及びガンマ型が脳脊髄液中にて特異的に上昇していることが判明した。今後の検出系、診断系開発が可能になったと考えた。

F. 研究発表

1. 論文発表  
1) Takahashi, H., Iwata, T., Kitagawa, Y., Takahashi, R.H., Sato, Y., Wakabayashi, H., Takashima, M., Kido, H., Nagashima, K., Kenney, K., Gibbs, C.J., and Kurata, T. Increased levels of ??and ? isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 6:983-985, 1999  
2) Nagashima, T., Okawa, M., Kitamoto, T., Takahashi, H., Ishihara, Y., Ozaki, Y., Nagashima, K. Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic



alcoholic. J. Neurological Sciences,  
163:192-198, 1999

- 3) Takahashi H, Takahashi RH, Hasegawa H,  
Horiuchi M, Shinagawa M, Yokoyama T,  
Kimura K, Haritani M, Kurata T, Nagashima  
K. Characterization of antibodies raised  
against bovine-PrP-peptides. J Neurovirol  
5:300-307, 1999.

2. 学会発表

なし

G. 特許申請

なし

## 分担研究報告書

## プリオン病の高感度診断技術の開発

主任研究者 品川森一 帯広畜産大学教授

研究要旨： 変性プリオンの高感度検出系のモデルとして感染性プリオンを接種したマウスの脳、脾臓、および白血球に蓄積される変性プリオンをモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法で検出した。脳内の Proteinase K 耐性のプリオンは接種後 70 日目までは認められなかったが、116 日目には容易に検出され、152 日目には著しく多量が蓄積していた。脾臓祭には接種 32 日目にはわずかではあるが 32kDa のバンドが認められた。70 日目には 27kDa のバンドも検出された。しかし接種後 116 日目、152 日目になっても蓄積量の著しい増量は認められなかった。白血球画分においても脾臓と同様の傾向が認められた。以上の成績から変性プリオンの早期検出において脾臓を検査対象として用いることの有用性が示唆された。

## 分担研究者

国立感染症研究所  
獣医科学部室長 神山恒夫

## 共同研究者

国立感染症研究所  
細胞化学部室長 山河芳夫  
細胞化学部 絹見朋也

175 日目までの観察で死亡する例は認められなかった。

## 3. 変性プリオンの検出

感染マウスの脳、脾臓、および末梢血白血球画分から定法に従ってホモジネートを調整し、1500G 遠心上清・200000G 遠心沈渣を膜画分として変性プリオンの検出に用いた。各膜画分はタンパク質：酵素比率を 100：1 として proteinase K 処理 (37℃、60 分間) を行った。各試料は SDS 処理後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動したタンパク質量はレーンあたり 30μg (脳)、100μg (脾臓) および 200μg (白血球) であった。泳動タンパク質はニトロセルロース膜に転写し、モノクローナル抗体 (クローン 6H4) との反応性を調べた。

## 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マウス順化スクレイピープリオンを接種したマウスの脳、脾臓および末梢白血球における変性プリオンの蓄積を追跡した。

## B. 研究方法

## 1. マウス順化スクレイピープリオン

品川らがスクレイピー発症ヒツジの脳をマウスに接種して順化させたプリオン (帯広株) を用いた。感染マウス脳を品川らの方法で乳剤とし、膜画分を調整した。

## 2. マウス接種と材料の採取

膜画分タンパク質 3 μg を一群 5 匹の 3 週令 ICR マウス脳内に接種した。接種後 32、70、116、152 日目に脳、脾臓、および白血球 (リンフォブレップを用いた遠心で分離) を採取した。検査を行うまで -80℃ で保存した。一部の脳は後日の病理検査用としてホルマリンで固定した。

なお、今回の感染の条件では、マウスは接種後 130 日目前後から立毛や消瘦を示し始めたが、

## C. 研究結果

## 1. 感染マウス脳における異常プリオンの検出 (図 1)

接種 116 日目以降の proteinase K で処理した脳の膜画分には主要な抗原サイズとして約 27 kDa と約 32 kDa のバンドが検出された、このうち 32 kDa 抗原の抗原量が多かった。感染 152 日目にはこれらの抗原量は著しく増加していた。しかし、感染 32 日目および 70 日目のマウス脳は Western blot の成績は陰性であった。これらの成績はこれまでプリオンタンパク質の種々の領域のペプチドに対するポリクローナル抗体を用いて得られた成績と一致している。

## 2. 感染マウス脾臓における異常プリオンの検出 (図 2)

接種 32 日目のマウス 5 匹中 4 匹の脾臓の膜画分に微量ながら約 32 kDa のバンドが検出された。検出量は接種 70 日目には著しく増加した。また 70 日目では 32 kDa 抗原に加えて 27kDa 抗原も認められた。しかしながらこれらの抗原の蓄積量はそれ以降は明瞭な増加傾向は示さず、逆に漸次減少しながら、接種後 116 日目、152 日目まで認められた。

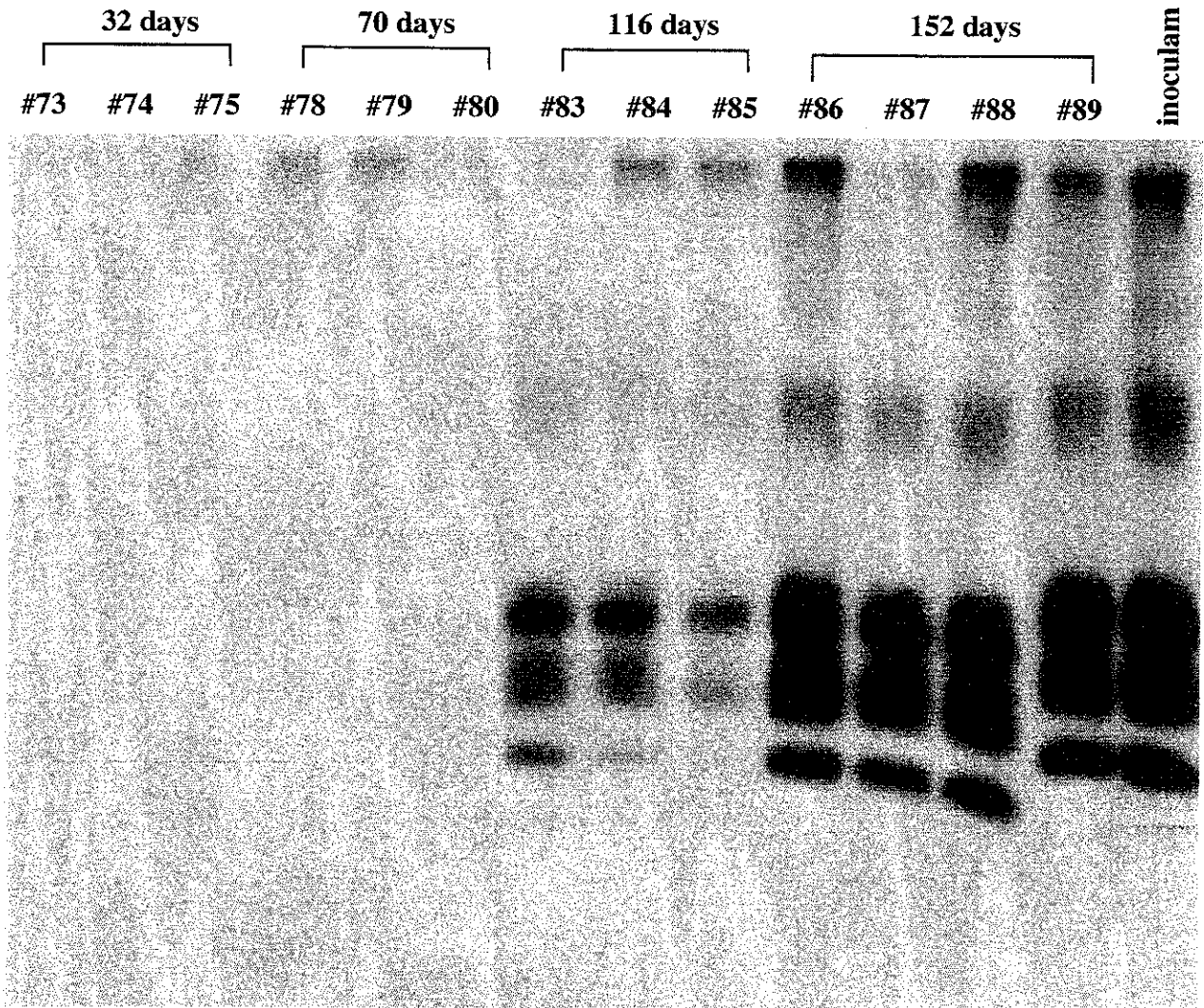
## 3. 感染マウス白血球画分における異常プリオンの検出

末梢白血球においてもウエスタンブロットによって異常プリオンと推定されるバンドが認められた。出現の時期が早いこと、経時的に減少傾向を示すことは脾臓における異常プリオン沈着の様相と類似していた。

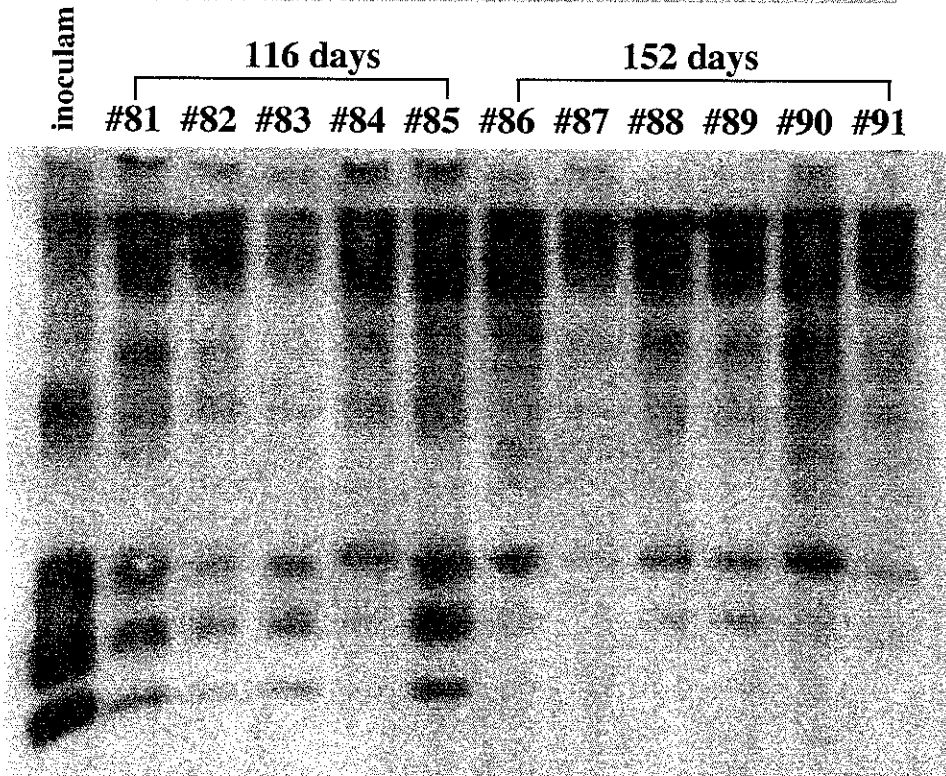
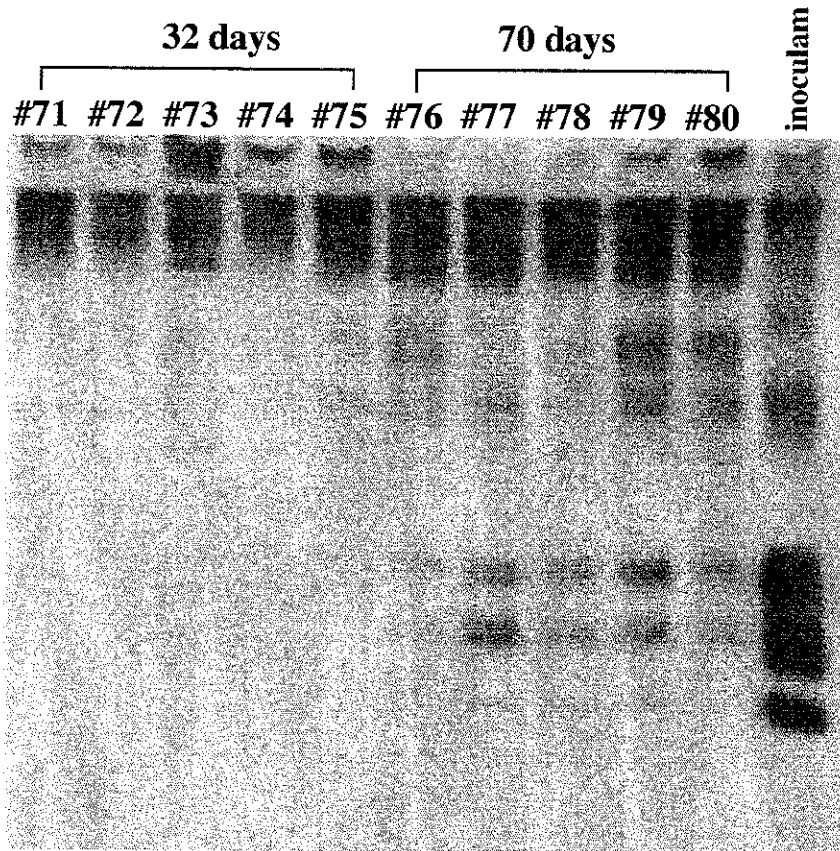
## D. 考察

今回の成績からマウスにおいては変性プリオンの早期検出に脾臓を検査対象として用いることの有用性が示唆された。白血球画分の使用に関してはさらに検討を要する。BSE プリオン等、マウス以外の異常プリオンの早期検出におけるこれらリンパ系組織の有用性についても今後の検討課題である。

## Accumulation of Prp<sup>res</sup> in mouse brain



# Accumulation of Prp<sup>res</sup> in mouse spleen



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

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) をタンパク変性剤で変性させ、界面活性剤で可溶化させた後、界面活性剤存在下、変性 PrP を抗 PrP 抗体と反応させる方法を検討した。ウシ大脳 P2 画分中の正常プリオンタンパク (PrP<sup>C</sup>) をモデル試料にして、SDS と guanidine thiocyanate (GdnSCN) とで順に処理した PrP の可溶化を、Sarkosyl、NP-40、CHAPS で比較した。その結果、0.2% Sarkosyl で可溶化した場合に、PrP の可溶化率および抗 PrP 抗体との反応において良好な結果が得られた。可溶化時にリン脂質の phosphatidylcholine を添加することで、可溶化率の上昇が認められた。この方法は、proteinase K 処理後に GdnSCN 変性させた異常プリオンタンパク (PrP<sup>SC</sup>) にも適用可能であり、抗 PrP 抗体を利用した PrP<sup>SC</sup> の濃縮法への応用が期待できる。

また、ホルスタイン種系ウシの大脳から PrP の cDNA をクローニングした。現在、組換えウシ PrP を大腸菌発現系で調製する作業を進めている。

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 (PrP) 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. 試料の前処理法（プリオンタンパクの抽出・濃縮方法）の検討
3. 大腸菌で発現させた組換えウシ PrP の調製
4. 細胞株の PrP の調製

前年度までに項目 1、4 について検討してきたが、今年度は項目 2、3 について検討した。

B. 研究方法

1. タンパク変性剤で変性させた PrP の可溶化  
ホルスタイン種系ウシの大脳 P2 画分 (10,000×g 遠心の沈殿画分、タンパク量約 50mg) に 5% SDS を加えて 10min 煮沸処理した後、メタノール沈殿でタンパクを回収した。次に、4M guanidine thiocyanate (GdnSCN) を加えて室温 30min 放置し、メタノール沈殿でタンパクを回収した。この変性剤処理済 P2 画分を用いて PrP の可溶化の条件検討を行った。

変性剤処理済 P2 画分に界面活性剤 (1% sodium N-lauroylsarcosinate (Sarkosyl)、1% NP-40、15mM CHAPS のいずれか) を加え、超音波細胞破碎装置で 2min 超音波処理した。この懸濁液を、乾固

した phosphatidylcholine (PC) 2mg を入れたサンプルチューブに移し、再び超音波処理した。遠心 (10,000×g、10min) し、上清を可溶化画分、沈殿を残渣とした。

2. 抗 PrP 抗体による PrP の免疫沈降  
変性剤処理済 P2 画分から得た可溶化画分に抗ウシ PrP 抗体を加えて一晚反応させた後、Protein G Plus / Protein A-Agarose (Oncogene 社) を加えて免疫沈降を行った。得られた沈降物中の PrP をイムノブロッティングで分析した。免疫沈降に用いる抗ウシ PrP 抗体としては、モノクローナル抗体 BSPX-54 (帯広畜産大学堀内基広博士、品川森一博士より分与) と、ウサギ抗血清 (抗 BPN 抗血清の抗原: Bovine PrP(104-123)-Cys-HSA [アミノ酸配列は、GGTHGQWNKPSKPKTNMKHVC]; 抗 HPN 抗血清の抗原: BSA-Cys-human PrP(95-114) [CTHSQWNKP SKPKTNMKHMAG]) を用いた。なお、BSPX-54 抗体は、イムノブロッティングでは PrP<sup>C</sup> と反応するが、ウシ大脳 P2 画分 (タンパク変性剤処理はしていない) の CHAPS 可溶化画分中の PrP<sup>C</sup> の免疫沈降では PrP<sup>C</sup> と反応しない。また、ウサギ抗血清は、免疫沈降とイムノブロッティングでは PrP<sup>C</sup> と反応することを確認している。

3. イムノブロッティング

試料を、SDS-PAGE (+2ME) 後、PVDF 膜に転写した。抗ウシ PrP 抗体 BSPX-54 を 1 次抗体とし、HRP 発色法または ALP 発色法で検出した。PrP のバンドの発色強度を画像解析により定量した。

4. ウシ PrP cDNA のクローニング

ホルスタイン種系ウシの大脳から RNA を抽出し、RT-PCR 法で PrP の cDNA を調製した。pBluescript II SK (+) ベクターにクローニングし、

DNA 配列を決定した。

## C. 研究結果

### 1. PrP の変性剤処理

異常プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) の混入した試料を分析するためには、予め PrP<sup>Sc</sup> を不活性化してからイムノアッセイすることが安全上望ましいと考えられる。この不活性化方法としては、SDS 処理やグアニジン処理などのタンパク変性剤処理が考えられる。そこで、ウシ大脳 PrP<sup>C</sup> をモデル試料にして、SDS、GdnSCN の順に処理した。

ウシ大脳 P2 画分をまず 5% SDS 処理し、メタノール沈殿で回収し、続いて 4M GdnSCN で処理し、メタノール沈殿で回収したが、この過程では、PrP の損失はなかった。

### 2. 変性 PrP の界面活性剤による可溶化

変性処理済 PrP では、変性処理していない PrP<sup>C</sup> と比べて可溶化率が低下することが予備実験で確認されたので、可溶化条件を検討した。

変性処理済 PrP の界面活性剤による可溶化率を比較した。変性処理済 P2 画分を 1% Sarkosyl、1% NP-40、15mM CHAPS で可溶化後、残渣に残った PrP をイムノブロットングで定量し、可溶化率を求めた (Fig. 1)。その結果、3つの界面活性剤の内では、Sarkosyl の可溶化率が最も高く約 80% であった。一方、NP-40、CHAPS では可溶化率が約 40% しかなかった。また、どの界面活性剤の場合でも、界面活性剤にリン脂質である PC を加えて可溶化すると、可溶化率の増加傾向が認められた。

そこで、可溶化率の最も高かった Sarkosyl について、その濃度と PrP の可溶化率の関係を調べた (Fig. 2)。その結果、0.2% Sarkosyl で約 70% の PrP が可溶化され、Sarkosyl 濃度を上げるとともに可溶化率が増加し、1.5% Sarkosyl では可溶化率が約 85% に達した。Sarkosyl に PC を加えて可溶化した場合には、Sarkosyl 濃度が 0.2% - 1.5% の範囲で約 85% の可溶化率が得られた。Sarkosyl 濃度が低い場合に、PC 添加により可溶化率の上昇が認められた。

### 3. 抗 PrP モノクローナル抗体による免疫沈降

変性処理後に界面活性剤で可溶化した PrP が、界面活性剤存在下に抗 PrP モノクローナル抗体 BSPX-54 と反応するかを、免疫沈降法を用いて検討した。変性 PrP の可溶化率が優れていた Sarkosyl を用い、可溶化に用いた Sarkosyl 濃度と BSPX-54 抗体で免疫沈降される PrP 量との関係を調べた (Fig. 3)。

その結果、0.2% Sarkosyl ± PC での可溶化画分で最大 (約 70 - 75%) の PrP が免疫沈降され、Sarkosyl 濃度が上がるに従って免疫沈降された PrP 量が減少した。Sarkosyl は可溶化力が強いが変性作用も強いために、抗原抗体反応が阻害されたと考えられる。また、可溶化時の PC 添加により PrP の免疫沈降率にわずかな改善傾向が見

られた。

なお、1% NP-40 ± PC、15mM CHAPS ± PC での可溶化画分中の変性 PrP は、BSPX-54 抗体で免疫沈降されなかった。BSPX-54 抗体は "unfolded" 状態の PrP を認識する特性をもつと考えられることから、比較的変性力の弱い NP-40 および CHAPS 存在下では、GdnSCN で変性させた PrP に部分的 "refolding" が起きて、BSPX-54 抗体が認識されなかった可能性が考えられる。

### 4. 抗 PrP ポリクローナル抗体による免疫沈降

抗 PrP 抗体としてウサギ抗血清を用いて免疫沈降を行った。その結果、タンパク変性剤処理した P2 画分から 1% Sarkosyl、1% NP-40、15mM CHAPS による可溶化画分のいずれでも PrP が免疫沈降された。ただし、免疫沈降された PrP 量は可溶化画分中の PrP 量を反映して、Sarkosyl 可溶化画分で多く、NP-40 と CHAPS の可溶化画分では少なかった。また、可溶化時に PC を添加しても PrP の免疫沈降率に明確な差は認められなかった。

ウサギ抗血清を用いた場合には、Sarkosyl、NP-40、CHAPS いずれの存在下にも、可溶化されている PrP と抗体とが反応したと考えられる。ポリクローナル抗体を用いる場合、免疫沈降用マトリックスが多量に必要なので、抗体のアフィニティ精製が必要である。今後、精製抗体を用いてさらに免疫沈降での解析を行い、ポリクローナル抗体の有用性を検討したい。

### 5. ウシ PrP cDNA のクローニング

ホルスタイン種系ウシの大脳から RNA を抽出し、RT-PCR 法で PrP の cDNA をクローニングした。ウシ PrP mRNA 配列は Yoshimoto ら [Virus Genes 6: 343-356 (1992)] が報告している。今回我々がクローニングした配列は、Yoshimoto らの報告にある pPCJY1 (Accession D10613) と一致した。現在、組換えウシ PrP を大腸菌発現系で調製する作業を進めている。

## D. 考察

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、微量のプリオンを濃縮するための前処理法を開発する必要がある。そのための方策として、抗 PrP 抗体を用いたプリオンの特異的濃縮法の開発が考えられる。そこで我々は、異常プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) をタンパク変性剤で変性させ、界面活性剤で可溶化させた後、界面活性剤存在下に変性 PrP<sup>Sc</sup> を抗体と反応させるプロトコルを想定して、濃縮法を検討した。PrP<sup>Sc</sup> は高濃度のグアニジン溶液中ではランダムコイルまたは "unfolded" な状態になり、可溶化し、伝達性も失うことが知られている。グアニジン変性下では PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> は立体構造的には区別がつかなくなると考えられる。そこで今回、SDS と GdnSCN で順に変性させた PrP<sup>C</sup> をモデル試料にして検討を行った。その結果、変性処理した PrP<sup>C</sup> を

界面活性剤 Sarkosyl で可溶化し、抗 PrP モノクローナル抗体と反応させることができた。これはグアニジン変性させた PrP<sup>Sc</sup>にも適用可能であり、これによって、抗体固定化カラム法、抗体固定化プレート法、免疫沈降法などによる PrP<sup>Sc</sup>の濃縮法への応用ができる。また、既存の各種抗 PrP 抗体を組み合わせることで、変性させた PrP<sup>Sc</sup>のサンドイッチ EIA の構築も期待できる。

この他に、今回、ホルスタイン種系ウシの脳から PrP の cDNA をクローニングした。現在、組換えウシ PrP を大腸菌発現系で調製する作業を進めており、得られた組換えタンパクを用いて、抗 PrP ウサギ抗血清のアフィニティー精製やウシ PrP のイムノアッセイのための定量用標準タンパクの調製を予定している。

## E. 結論

平成 11 年度は、ウシ脳 PrP<sup>C</sup> をモデル試料にして、PrP をタンパク変性剤で変性させ、界面活性剤で可溶化させた後、界面活性剤存在下に変性 PrP を抗体と反応させる方法を検討した。SDS と GdnSCN とで順に処理したウシ脳 P2 画分中の PrP<sup>C</sup> の可溶化を、Sarkosyl、NP-40、CHAPS で比較した。その結果、0.2% Sarkosyl で可溶化した場合に、PrP の可溶化率および抗 PrP モノクローナル抗体 BSPX-54 との反応において良好な結果が得られた。可溶化時にリン脂質の phosphatidylcholine を添加することで、可溶化率の上昇が認められた。この方法は proteinase K 処理後にグアニジン変性させた PrP<sup>Sc</sup>にも適用可能であり、抗体固定化カラム法、抗体固定化プレート法、免疫沈降法などによる PrP<sup>Sc</sup>の濃縮法への応用ができる。

また、ホルスタイン種系ウシの脳から PrP の cDNA をクローニングした。現在、組換えウシ PrP を大腸菌発現系で調製する作業を進めている。

## F. 研究発表

### 学会発表

1. Yutaka Kikuchi, Takeshi Yamazaki, Kohsuke 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 9-14, 1999, New Mexico, USA.
2. 菊池裕、山崎壮、今沢孝喜、武木田薫、西川秋佳、高鳥浩介、谷村顕雄、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細胞内分布の解析。第 72 回日本生化学会大会（1999 年 10 月 6 日～9 日、横浜）
3. 武木田薫、菊池裕、山崎壮、藤沢正彦、品川森一、高鳥浩介、谷村顕雄、澤田純一：プリ

### オンタンパクのイムノアッセイ法の開発

(1) 抗 PrP 抗体の作製及び比較。日本薬学会第 120 年会（2000 年 3 月 29 日～31 日、岐阜）（予定）

3. 山崎壮、武木田薫、菊池裕、品川森一、高鳥浩介、谷村顕雄、澤田純一：プリオンタンパクのイムノアッセイ法の開発 (2) 抗体を用いたプリオンタンパクの濃縮法の検討。日本薬学会第 120 年会（2000 年 3 月 29 日～31 日、岐阜）（予定）



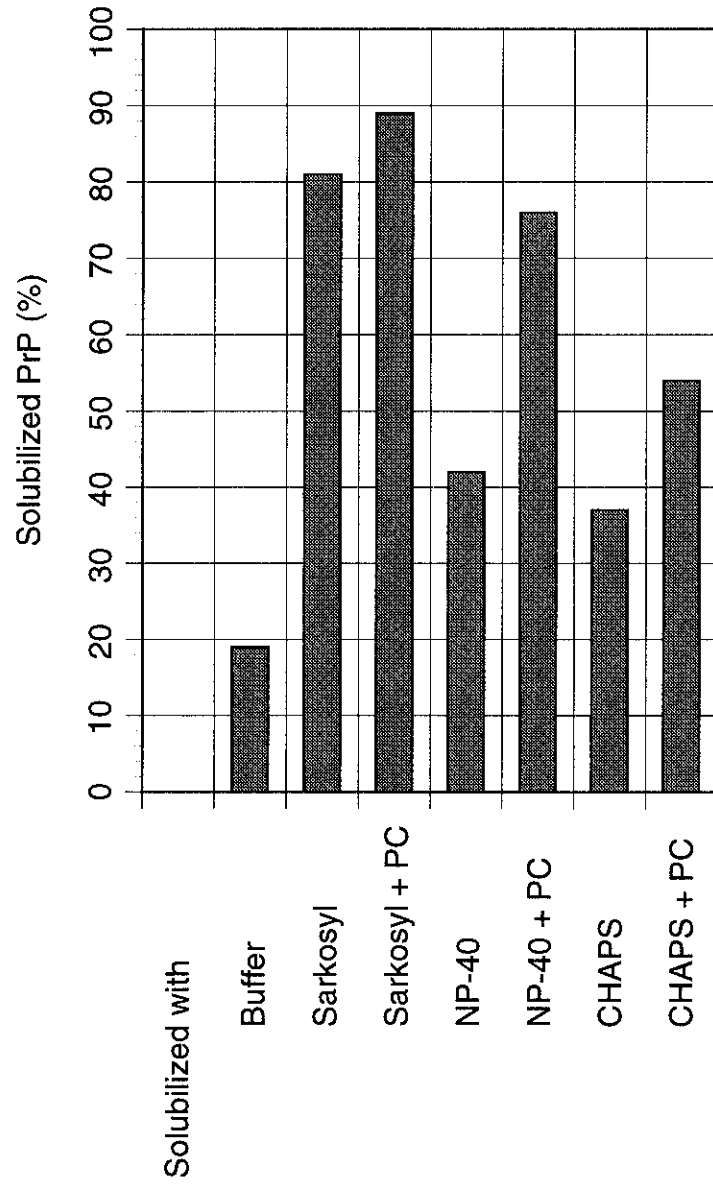


Fig. 1 Solubilization of PrP from SDS/GdnSCN-treated bovine brain P2 fraction with detergents and phosphatidylcholine (PC). The amount of PrP in the untreated P2 fraction is expressed as 100%.

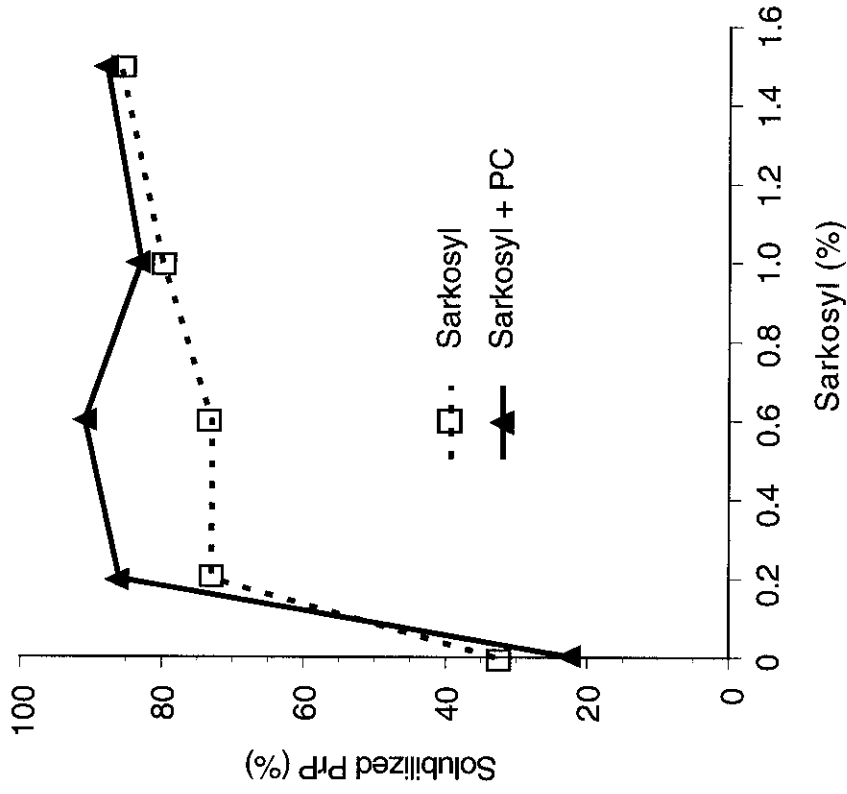


Fig. 2 Solubilization of PrP from SDS/GdnSCN-treated bovine brain P2 fraction with Sarkosyl and phosphatidylcholine (PC). The amount of PrP in the untreated P2 fraction is expressed as 100%.

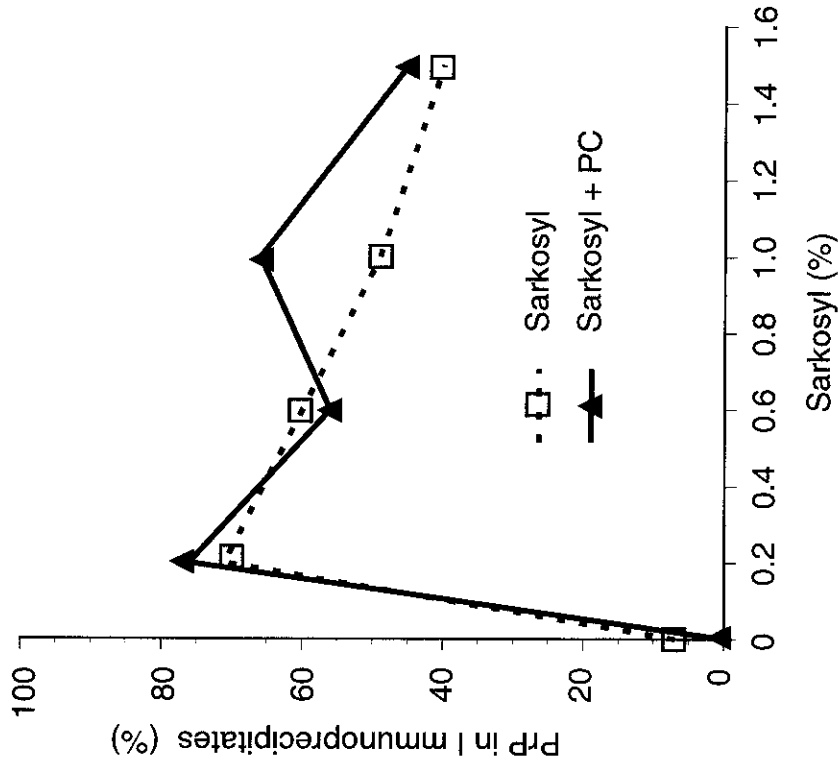


Fig. 3 Immunoprecipitation of PrP in solubilized fractions from SDS/GdnSCN-treated bovine brain P2 fraction with Sarkosyl and phosphatidylcholine (PC) using anti-PrP monoclonal antibody BSPX-54. The amount of PrP in the untreated P2 fraction is expressed as 100%.

## 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がプリオン蛋白質を認識するハイブリドーマは得られなかった。そこで、マウス細胞株にヒトプリオン遺伝子を導入し、安定にヒトプリオン蛋白質を発現する細胞株を樹立、抗原としてマウスを免疫した。蛍光抗体法とウエスタン法によりヒトプリオンタンパク質を認識するポリクロ抗体が得られた。また、樹立した細胞株の性状を解析したところ、親株に比較して細胞密度が高くなると増殖が抑制され、DNA 合成阻害剤に抵抗性を示した。長期間の培養でも細胞生存率は高かった。これらから正常プリオンタンパク質の機能として、適度な細胞密度に達すると細胞増殖を停止し、静止期を維持する作用への関与が示唆された。

### G. 研究目的

プリオン病は稀な疾患ではあるが、血しょう分画製剤は数万人の血液から作られるために、ドナーが採血後にプリオン病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の作製を試みた。また、Balb/c マウス由来の繊維芽細胞株 (3T3) と B10 マウス由来の B16 メラノーマ細胞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。さらに樹立した細胞株のプリオン蛋白質発現による生物学的特性を解析するために、空のベクターのみを導入した細胞と増殖能、マイトマイシン抵抗性、細胞周期について解析した。

### 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、高い抗体価は得られなかった。このマウスの脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製したが、抗体を産生しているハイブリドーマを樹立することはできなかった。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細胞と B16 メラノーマ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 3T3-3-8, 3T3-9-1, 3T3-9-2, B16-15-10, B16-15-12 の計 5 株を得た。3T3 から得られた株は 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)。しかし、B16 細胞由来の株ではプリオンタンパクは細胞表面に存在していなかった。ウエスタンブロット法で検出すると、3T3 由来の細胞株では 32K 付近にスメア-をひくバンドと 23K と 28K 付近にコントロールの細胞に存在しないバンドが認められた。一方、B16 細胞では 28K のバンドのみ認められた。32K のバンドが認められなかったため、B16

細胞で発現しているプリオンタンパクは細胞表面に発現していないことがウエスタンの結果からも明かとなった。B16-15-10 及び 15-12 細胞をマウスに免疫して得た抗血清は蛍光抗体法を用いて解析したところ、Cos7 細胞に発現させたプリオンタンパクを検出できた。しかし、ウエスタンでは糖鎖が付いた 32K のバンドは検出できなかった。ところで、樹立したプリオン発現株は形態的に紡錘形にならずに数石状になることに気付いた。そこで、発現細胞の特性について解析した。培養液を交換しないで長期間（17 日）培養したところ、対象の細胞株は多くの細胞が死滅し、細胞数が減少したのに対し、プリオンタンパク発現細胞は細胞の減少は観察されなかった (Fig.2)。同様に、マイトマイシンを培養液に添加して 48 時間培養後の生細胞数を数えたところ空ベクターを導入した細胞株に比してプリオンの発現している株のほうが生細胞数が多かった。さらに、FACS を用いて細胞周期を解析したところ、細胞密度が低い条件下ではプリオンの発現に関わらず細胞の DNA 量は  $2n$  から  $4n$  であり細胞が分裂していることを示していたが、細胞密度が高くなると、親株は細胞増殖を維持していたが、プリオン発現細胞は  $2n$  を示し、細胞増殖を停止した状態になった (Fig.3)。H3 の取り込みでも細胞周期の解析と同様の結果が得られた。

#### D. 考察

ペプチドを用いた免疫法で得られたマウスの血清を用いて、樹立したヒトプリオン蛋白を発現する細胞株を蛍光抗体法で解析した結果、ペプチドに対して反応性を示してもプリオン蛋白質を認識できた血清は 1 検体だけであった。一方、プリオン蛋白を発現した B16 細胞で免疫したマウスは 5 匹中 5 匹がプリオン蛋白質を検出できた。これら

からプリオン蛋白で免疫したほうがナイーブな抗原を認識する抗体が得やすいと考えられた。抗原として大腸菌由来のリコンビナント蛋白を用いることもできるが、正常プリオン蛋白は糖鎖が付いて細胞表面に発現しているので、マウスや CHO 細胞などの真核細胞からの抗原の方が良好な結果が得られるかも知れない。また、プリオン蛋白を発現している細胞株の特性を解析したところ、壊死かアポトーシスかは不明だが細胞死を抑制する作用の存在が示唆された。その機序として細胞間の接触によるシグナルが、細胞表面に発現しているプリオン蛋白を介して細胞周期をコントロールしている可能性がある。しかし、3T3 細胞は本来の性質としてコンタクトインヒビションがある（静止期を維持する）ことが知られており、また、3T3 細胞は変異を生じ易い性質があることから慎重な解析が必要だ。他の細胞を用いた検索を現在進めている。また、実用面からすると、プリオン蛋白を除去するためには抗体の他に、もしリガンドが存在していると仮定すれば、リガンドを用いる方法も考えられる。ヒト由来のリガンドであれば、製剤に混入してもマウス由来の抗体と比べて生体の反応は少ないと推定される。樹立した細胞株とリンパ球の結合を見ると、1 部のリンパ球が細胞株に接着していることが観察され、リガンドの存在を示唆していると考えている。

#### E. 結論

ヒトプリオン蛋白に対する単クローン抗体は、ペプチドを用いては作製することはできなかった。一方、ヒトのプリオン蛋白を持続的に発現するマウス細胞で免疫したところ、プリオンを認識するポリクロー抗体が得られた。また、ヒトプリオン蛋白を持続的に発現する細胞株は細胞密度によって