

図2 : PrPLP mRNAの経時的発現変化。

(a) Ngsk *Prnp*^{+/-} マウス脳。

(b) Ngsk *Prnp*^{0/0} マウス脳。

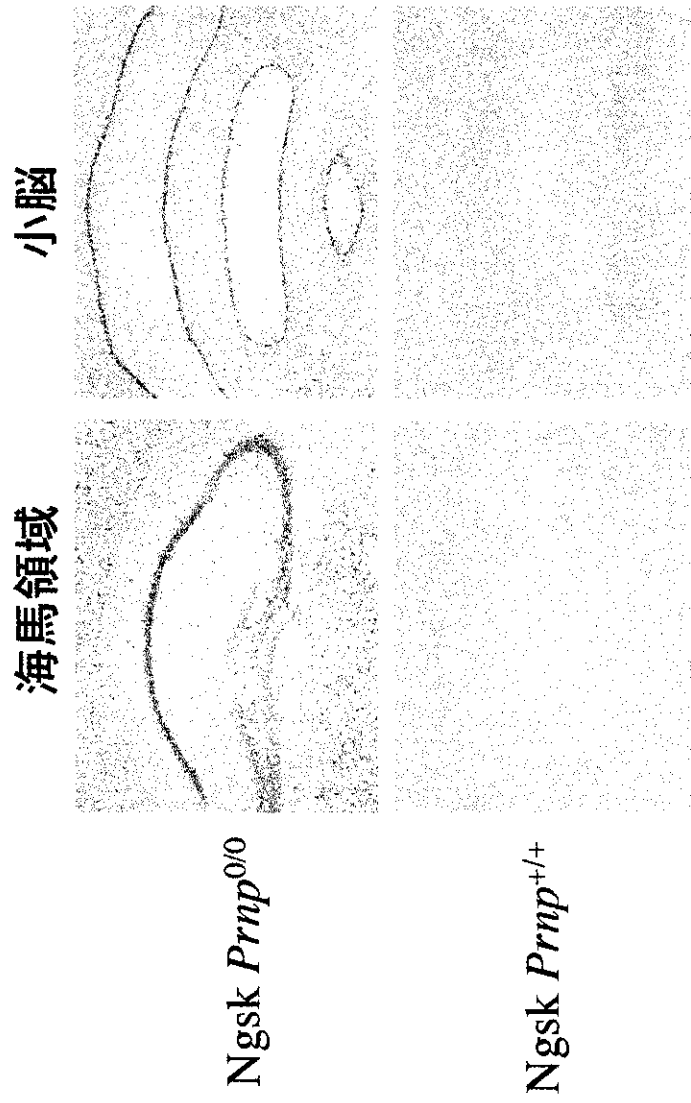


図3 : Ngsk *Prnp*^{0/0}マウス (20週令) 脳における PrPLP異所性発現 (*in situ* hybridization)

ニワトリ及びノックアウトマウスを用いた抗PrPモノクローナル抗体の樹立

班員：松田治男（広島大学・生物生産・免疫生物）
班員：毛利資郎（九州大学・大学院医・動物施設）
班員：北本哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：中村尚登（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：三多弘幸（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：青木悠里（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：村本 環（東北大学・大学院医・病態神経）

〔研究要旨〕

ニワトリとPrPノックアウトマウスを用いて、PrP特異的モノクローナル抗体の作成を試みた。ニワトリを用いた実験では、細胞融合実験から1種（HUC4）、ファージディスプレイ実験から3種（HUC5、HUC5'およびHUC6；いずれもファージ発現型と可溶型を作成）が得られた。しかし、これらのいずれの抗体においても、種々のrHuPrPを用いたELISA実験からPrP50~120残基の領域に存在するエピトープを認識すると予想される抗体であった。ウエスタンブロットングにおいて、HUC4は既報のHUC2-13と比較して異なる反応パターンを、また3種のリコンビナント抗体は主として二糖鎖・無糖鎖型バンドを特異染色し、一糖鎖型バンドとの反応性は弱い抗体であった。ノックアウトマウスを用いた実験では、免疫原としてPrP^{Sc}感染細胞株ScN2aを用いた。三匹のマウスを用いた免疫実験で、個体差があったもののrHuPrPよりもrMoPrPに対して高い免疫応答を示した。これらのマウスを用いたモノクローナル抗体の作成は現在進行中である。ノックアウトマウスを用いて得られている既知のPrP特異的モノクローナル抗体（IgM）を産生する2種のハイブリドーマについて、*in vitro*における抗体クラススイッチ誘導実験を行い、1種のハイブリドーマについてIgG2aの産生を確認した（現在クローニング中）。以上の実験から、PrP特異抗体の作成において、ニワトリを用いたリコンビナント抗体の作成やScN2aとノックアウトマウスの組み合わせによる抗体作成の有用性が確認できた。

Establishment of Monoclonal Antibodies against Prion Protein using Chickens and PrP-Knockout Mouse

Haruo MATSUDA, Naoto NAKAMURA, Yuri AOKI, Hiroyuki MITSUDA, Shiro MOHRI¹, Tamaki MURAMOTO² and Tetsuyuki KITAMOTO²

Department of Immunobiology, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, ¹Center of Biomedical Science, Faculty of Medicine, Kyushu University and ²Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

ABSTRACT

Chicken monoclonal antibodies were generated in cell fusion and phage display methods using chickens immunized with recombinant human prion protein (rHuPrP23-231). One from the fusion experiment and the residual antibodies as recombinant types were reactive to rHuPrP23-231 but not rHuPrP121-231 in ELISA and mouse PrP^C in Western blotting. However, since sera from the immunized chickens were highly specific to the rHuPrP23-231 and we obtained the antibody gene library, it may be able to expect making recombinant monoclonal antibodies specific for other epitopes of PrP. In another experiment using PrP-knockout mouse, the three mice were immunized with PrP^{Sc}-infected cell line ScN2a. The antibody response to rPrP in these mice increased gradually with sequential immunizations. By fusion experiments using these mice, it may be generated mouse monoclonal antibodies to two kinds of PrP isoforms, PrP^C and PrP^{Sc}. On the other hand, for immunoglobulin class-switching of mouse monoclonal antibodies (IgM), 11H1 and 4A3, these hybridomas were cultured on fixed CD40L-expressing BHK cells with recombinant IL-4. Nine to 12 days later, the 4A3 hybridoma cells produced also IgG2a isotype together with IgM. The

cell cloning is in progress.

〔はじめに〕

プリオンタンパク (PrP) 特異的ニワトリ抗血清の作成 (1) や著者らによるPrP特異的ニワトリモノクローナル抗体作成の成功 (2) が報告されるようになり、哺乳動物のPrPに特異的な抗体の作成にニワトリが有用であることが理解され始めてきた。また、PrPノックアウトマウスを免疫動物としてPrP特異抗体の作成が複数報告 (3,4,5) されており、今後はPrP特異的モノクローナル抗体の作成には、主としてニワトリやPrPノックアウトマウスの活用が主流になるものと想像される。昨年、私達はヒトを含む哺乳動物のPrPのN末端領域を認識するニワトリモノクローナル抗体 HUC2-13について、ファージ発現抗体並びに可溶性抗体の作出に成功した。

〔目的〕

本研究では、ニワトリとPrPノックアウトマウスを免疫動物として活用し、PrP特異的モノクローナル抗体を樹立することを試みた。また、すでに作成に成功しているHUC2-13抗体のリコンビナント抗体について、その特性についても新たな検討を加えた。さらに、ノックアウトマウスを用いて作成された既知のPrP特異抗体 (IgM抗体) 産生ハイブリドーマをIgG産生型に変換するためのin vitro 抗体クラススイッチシステムの構築のための実験もあわせて試みた。

〔材料と方法〕

1. 実験動物

実験動物として、白色レグホン種純系ニワトリH-B15およびPrPノックアウトマウスを使用した。動物福祉の観点から、使用したこれらの実験動物の使用数を最小限にするとともに、飼育環境に配慮するため実験動物舎の衛生管理を徹底した。使用後の実験動物は、広島大学生物生産学部附属農場の実験動物用焼却炉で焼却し、同農場主催の動物慰霊祭に参列することで実験に供した動物の霊に感謝を表した。

2. 免疫

3羽の4週齢ニワトリに、リコンビナントヒトPrP (rHuPrP23-231) を免疫した。また、PrPノックアウトマウスには、PrPsc感染細胞株ScN2aを免疫した。

3. 細胞融合

細胞融合実験は、免疫ニワトリ脾細胞と融合用細胞株MuH1を用いて、著者らの方法 (6) に準じて実施した。PrPノックアウトマウスの免疫脾細胞はマウスミエローマ細胞株SP2と融合した。

4. V_H と V_L の増幅

V_H と V_L の増幅は、免疫脾細胞から作成した cDNA を元に KOD DNA ポリメラーゼを用い PCR で行った。なお、プライマーはニワトリ抗体遺伝子の特性である 5'、3' 側の配列がそれぞれ同一であることから V 領域が完全にカバーできる一対プライマーを設計し用いた。

5. scFv の調整

単離、精製した V_H と V_L は、(Gly4-Ser)₃ をコードする塩基配列を有するリンカーと同一モル比で PCR によりアッセンブル・増幅させた。

6. ファージ発現 scFv の調整

単離、精製した scFv 遺伝子は、Eag I BssH II で制限酵素処理し、同様に処理した発現ベクター pPDS にライゲーションし、サブレッサー株の XL1-Blue に形質転換した。得られたコロニーは、アンピシリンを添加した SOC 培地で培養し、VCSM13 ヘルパーファージを感染させた。1時間の感染の後、遠心によって培養上清をすて新たに終濃度 250 mM IPTG を含むアンピシリン・カナマイシン含有 SuperBrowth 培地で終夜培養し、遠心後、の培養上清をファージ発現 scFv として用いた。

7. 可溶性 scFv 抗体の調整

可溶性抗体は、ファージ発現 scFv をノンサブレッサー株 SOLR に1時間感染させ、アンピシリン含有 SuperBrowth 培地で終夜培養し、その培養上清および菌体破壊によって得られたものを可溶性抗体として用いた。

8. ELISA

ハイブリドーマ培養上清、ファージ発現抗体 および可溶性抗体 の反応性は、ELISA法を用いた。ヒト PrP をコートしたプレートにファージ発現抗体および可溶性抗体を加えて反応後、アルカリフォスファターゼ標識抗ニワトリ IgG (H+L) 抗体、パーオキシダーゼ標識抗 M13 抗体あるいはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス カッパー鎖 抗体を用いて検出した。なお、抗原にはrHuPrPの他HisタグのついたマウスrPrP (His-MoPrP, 品川博士より分与) も用いた。

9. ウエスタンブロッティング

正常マウス、ヒツジおよびヤギ脳から膜フラクション調整し、ウエスタンブロッティングは常法に従って行った。また、実験によっては、ScN2a細胞株から調整した試料も用いた。

10. マウスCD40リガンド (CD40L) 発現BHK細胞

抗CD3抗体で活性化したBALB/cマウスT細胞を材料として、マウスCD40L遺伝子をBHK発現ベクターpKCRneoにクローニングした。コンストラクトをBHK細胞にトランスフェクトし、最終的に2種のマウスCD40L発現BHK細胞 (C45とF8) を作出した。これらの発現細胞がIL-4存在下で正常マウスB細胞の免疫グロブリンクラスをIgMから他の抗体クラスにスイッチ誘導することを確認した。

11. PrP特異的マウスモノクローナル抗体 (IgM) のクラススイッチ誘導

上述したCD40L発現BHK細胞を固相化したプレートで、PrP特異的マウスモノクローナル抗体 (IgM) 産生ハイブリドーマ (11H1と4A3、横山博士より分与) をIL-4存在下で培養し、抗体のクラススイッチ誘導を行った。培養後、経時的に培養液中の抗体のクラスをELISA法で調べ、クラススイッチ誘導が確認されたウエルの細胞についてはクローニングを行った。

〔結果〕

rHuPrP免疫ニワトリから得た免疫脾細胞を用いて、融合実験による特異ハイブリドーマの作出と脾細胞から直接リコンビナント抗体の調整を行った。融合実験においては、rHuPrP抗原を反応したモノクローナル抗体が1種 (HUC4) 得られた。一方、免疫脾細胞から調整したcDNAを出発材料としてファージ発現抗体 (パニング前抗体) を得た。このファージ発現抗体を用いた連続したパニング操作を3回行った。これらの実験を2回実施したところ、1回目の実験では3回目のパニングで反応の低下があったが、2回目の実験においてはパニング毎に反応性が高くなった (図1)。最終的に、HUC4のほか3種のファージ発現抗体 (HUC5p、HUC5'p およびHUC6p) を任意に選抜した。

作成できた3種のファージ発現抗体は可溶性抗体 (HUC5s、HUC5'sおよびHUC6s) を構築するとともに、これらのVHおよびVLの塩基配列を調べた。その結果、3種の抗体のVLの塩基配列は共通で、また2種の抗体のVHの配列も1塩基の変異を除いて共通であった。これら3種のリコンビナント抗体 (ファージ発現抗体と可溶性抗体) について、マウス脳から調整した膜フラクションを用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、これらの抗体はいずれも二糖鎖付加型と無糖鎖型を特異染色し、一糖鎖付加型に対する反応は弱かった (図2)。

一方、ハイブリドーマ由来抗体としてのHUC4について、マウスおよびヒツジ脳試料とScN2a (PK-と+の条件) を用いてウエスタンブロッティングをHUC2-13 (N末抗体) と比較した。その結果、両抗体による特異染色に大きな差異が認められ、特に、HUC2-13はScN2a (PK-) のマルチバンドを検出したが、HUC4は全く反応性を示さなかった (図3)。

3匹のノックアウトマウスにScN2aを高度免疫し、血清の抗PrP抗体価をELISAで調べた。その結果、3匹のマウスは、いずれもrHuPrPよりもrMoPrPに対して高い免疫応答を示した (図4)。これらのマウスの1匹を用いて、免疫脾細胞とマウスミエローマ細胞株SP2を用いて細胞融合を行った。現在、すでに多数のハイブリドーマが増殖してきている (現在、実験進行中)。

2種の抗PrP特異的マウスハイブリドーマ (11H1と4A3、いずれもIgM抗体産生) を、rIL-4存在の固定CD40L発現BHK細胞上で12日間培養した。11H1については、培養液中に分泌された抗体はIgMのままであったが、4A3は培養経過とともにIgM以外にIgG2aクラスの抗体が検出された。培養12日後に、クローニングを行った (現在、実験進行中)。

〔考察〕

今回のPrP特異的ニワトリモノクローナル抗体の作成実験において、融合実験から得られたHUC4は昨年度報告したN末認識のHUC2-13と比較したウエスタンブロッティングで異なる反応性を示す抗体であることが明らかとなった。免疫脾細胞を用いたリコンビナント抗体作成実験において、免疫脾細胞を用いて最終的に得た3クローンのファージ発現抗体や上記HUC4抗体は、いずれもrHuPrPと反応したが、N末ペプチド(23-49)やrHuPrP121-231とは反応しなかったことから、これらの抗体の認識エピトープは50-120の領域に存在するものと考えられた。得られた3クローンのリコンビナント抗体を用いたウエスタンブロッティングでパンニング前のファージ発現抗体のライブラリーサイズの拡大を図ることが出来れば、さらに特異性の異なる抗体の作成が期待される。また、リコンビナント抗体の特異性は、ハイブリドーマ由来抗体と異なりVHとVLのシャッフリングに大きく依存することから、抗体ライブラリーサイズを大きく出来れば融合実験からは得られない特異性を持った抗体の作出が期待される。

一方、近年PrPノックアウトマウスを用いたPrP特異的マウスモノクローナル抗体が作成されるようになってきたが、本研究では、PrPsc特異的抗体の作出も念頭にして、ノックアウトマウスにPrPscを発現する培養細胞株ScN2aを免疫原として使用した。rPrPを検出用抗原としてELISAを行ったが、当初予想したようにrPrPに対する免疫応答の上昇は緩慢であった。恐らく、ScN2aの発現するPrPscやPrPc量が少なかったためと考えられた。しかし、高度免疫によって1匹については1万倍近い抗体力価が得られたことから融合実験に供した。この実験は現在進行中で、モノクローナル抗体が得られるかどうか不明であるが、今後の成果が期待される。またこの実験から、PrPsc特異的モノクローナル抗体が得られる可能性もあるといえる。国内外の研究者によって、すでにPrPノックアウトマウスを用いたPrP特異的マウスモノクローナル抗体が作成されている。興味ある事実として、そのいくつかの抗体クラスがIgMであることである。その理由は明らかではないが、本実験ではノックアウトマウス由来の既知の2種マウスハイブリドーマ(IgM産生型)を用いて、その内の1種で抗体のクラススイッチ誘導に成功した。この成果は、今後ノックアウトマウスを用いて得られた抗PrPマウスモノクローナル抗体(IgM)の抗体クラススイッチ誘導を可能にするだけでなく、その他の多くの有用なマウスモノクローナル抗体(IgM)にも適用できるとものと思われる。

〔文 献〕

- 1) Groschup, M. H., Harmeyer, S. and Pfaff, E.: Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J. Immunol. Methods* 207: 89-101, 1997
- 2) Matsushita, K., Horiuchi, H., Furusawa, S., Horiuchi, M., Shinagawa, M. and Matsuda, H.: Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 777-779, 1998
- 3) Krasemann, S., Groschup, M., Harmeyer, S., Hunsmann, G. and Bodemer, W.: Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0}-mice. *Mol. Med.* 2: 725-734, 1996
- 4) Williamson, R. A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Butron, D. R.: Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7279-7282, 1996
- 5) Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. and Oesch, B.: Prion (PrPsc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature (Lond.)* 390: 74-77, 1997

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) 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. and Med. Microbiol.*, 23, 189-194, 1999
- 2) Fukushima, K., Murata, Y., Seto, T., Furusawa, S. and Matsuda, H. In vitro system for immunoglobulin class switching using BHK cells transfected with murine recombinant CD40 ligand. *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 615-619, 1999

- 3) Nakamura, N., Aoki, Y., Horiuchi, H., Furusawa, S., Yamanaka, H., Kitamoto, T. and Matsuda, H. Construction of recombinant monoclonal antibodies from a chicken hybridoma line secreting specific antibody. *Cytotechnol.*, 2000 (in press)

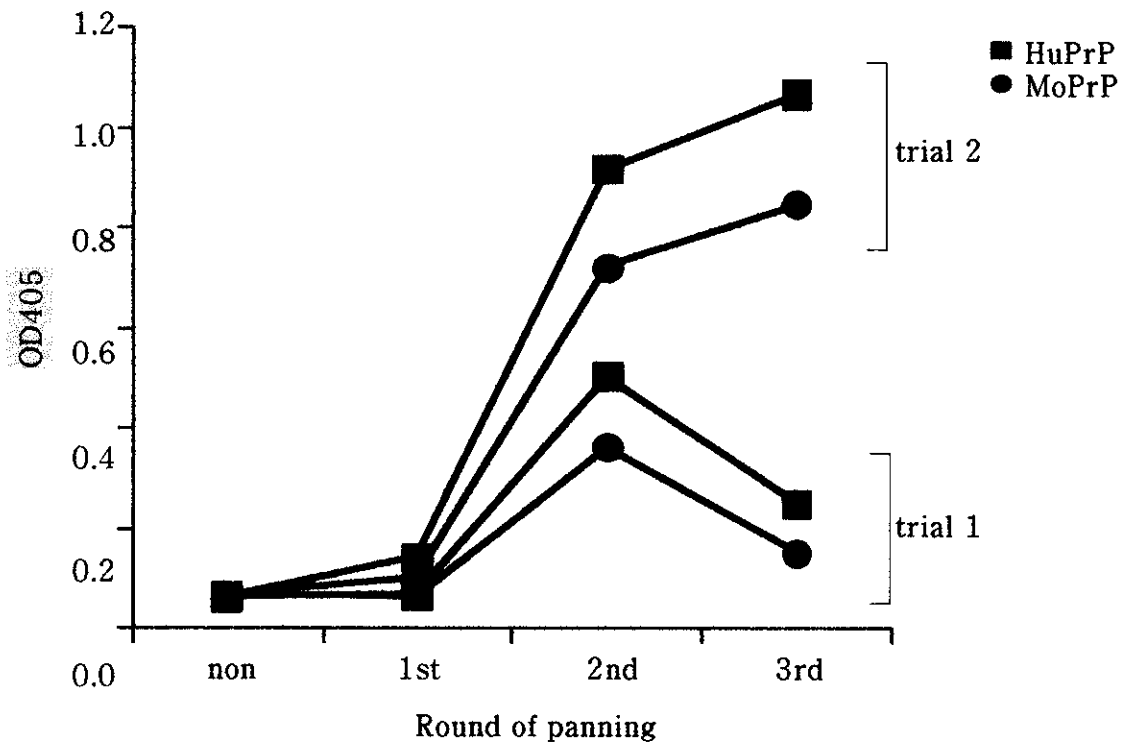


図1. 抗PrPファージディスプレイ抗体の連続パニング (1st trialおよび2nd trial)

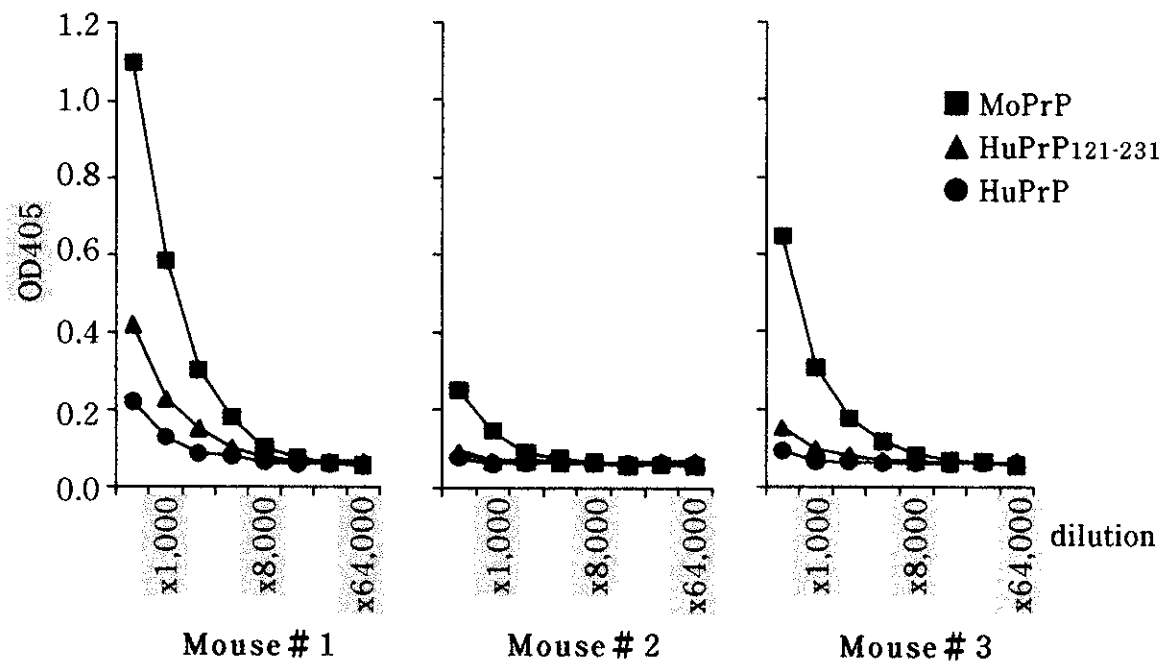


図4. ScN2a免疫ノックアウトマウスの免疫応答

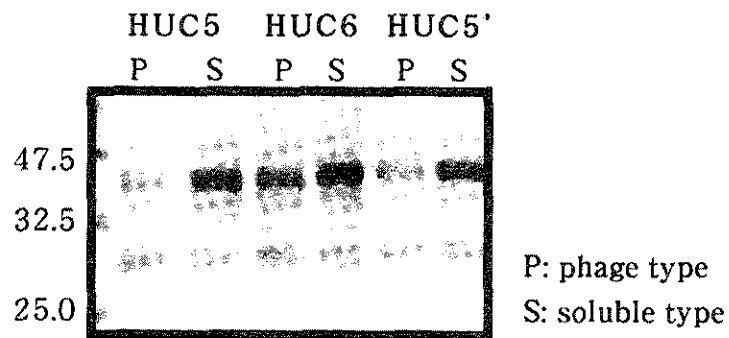


図2. Western blottingによるHUC5, HUC6およびHUC5'の
マウスPrPcに対する反応性

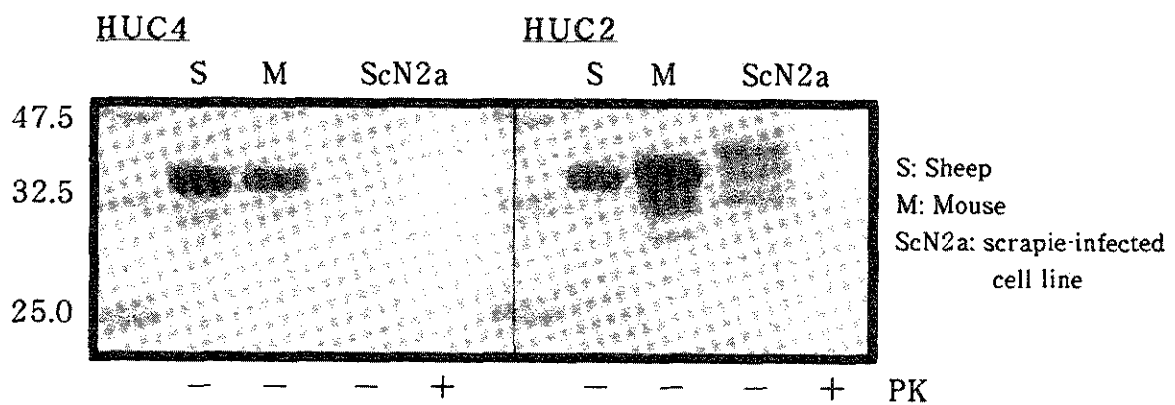


図3. Western blottingによるHUC4とHUC2の反応性の比較

ヒト型プリオン蛋白特異的モノクローナル抗体#41 および#71 の解析と CJD における同抗体反応プリオン蛋白の局在

研 員：田中 智之（和歌山医大・微生物学教室）
協 力 者：北元 憲利（姫路工業大学・環境人間学部）
協 力 者：村本 環（東北大学・医・病態神経学講座）
班 員：北本 哲之（東北大学・医・病態神経学講座）
班 員：毛利 資郎（九州大学・医・動物実験）
協 力 者：辻 力（和歌山医大・法医学教室）
協 力 者：吉田 宗平（和歌山医大・神経内科学教室）
協 力 者：藤井 秀治（国立長崎中央病院・検査科病理）

〔研究要旨〕

大腸菌にて発現されたヒト型プリオン蛋白に対する特異的モノクローナル抗体(MAb)を作製した。得られた MAb#41 および MAb#71 を解析し、エピトープの決定を行った。これらの抗体は PrPc に特異的で PrPsc に特異的ではなかった。また、これらはヒト型プリオン蛋白の 215aa から 219-220aa のループ部分を認識していることが明らかとなった。

MAb#41 を用いた 5 例の孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) の免疫染色の染色パターンは、大脳、小脳および脊髄のプリオン班、シナプスに染色された。しかし、その他の内臓組織、すなわち脾臓、各所リンパ節、腸管のパイエル氏板には染まらず、variant CJD とは異なった所見であった。一方、神経学的に正常と考えられる 19 歳から 85 歳までの大脳、小脳および ALS、Alzheimer's disease、Parkinson's disease などの他の中枢神経系疾患 17 の海馬回では全例陰性であった。このことから、これらの疾患の原因的要因には MAb#41 で認識するプリオン蛋白の異常沈着の関与は考えられなかった。

Characteristics of Monoclonal Antibody #41/#71 to Human Prion Protein, and Localization and Accumulation Patterns of Prion Protein in Five Cases of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease.

Tomoyuki TANAKA ¹⁾, Noritoshi KITAMOTO ²⁾, Tamaki MURAMOTO ³⁾, Tetsuyuki KITAMOTO ³⁾, Shirou MOHRI ⁴⁾, Tsutomu TSUJI ⁵⁾, sohei YOSHIDA ⁶⁾ and Hideharu FUJII ⁷⁾

- 1) Department of Microbiology, Wakayama Medical College
- 2) Humanities for Environmental Policy and Technology, Himeji Institute of Technology
- 3) Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine
- 4) Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Kyushu University
- 5) Department of Legal Medicine, Wakayama Medical College
- 6) Department of Neurology, Wakayama Medical College
- 7) Division of Pathology of Laboratory Medicine, National Nagasaki Chuo Hospital

ABSTRACT

The generation of three clones which secreted specific monoclonal antibodies to human prion protein (Hu-PrP) was succeeded. Subclones MAb #41/#71 from these clones were analyzed with Western-blotting, epitope mapping and immunohistochemistry. By epitope mapping these clones recognized at the position of 215 aa and 219-220 aa of

Hu-PrP. As the results of immunohistochemistry MAb#41/#71 reacted with prion plaque and synaps of brain in case of Creutzfeldt-Jacob disease (CJD). Detail localization and accumulation pattern of Hu-PrP were examined in five cases of sporadic CJD. Reactivities of Hu-PrP with MAb #41 were consistent with prion plaque and synaps with various density. The localizations were not only cerebrum and cerebellum but spinal cord in these sporadic CJD. However, no positive reaction was observed in spleen, lymph nodes and Peyer's patches of gastro-intestinal tracts as shown positive reaction in tonsil and appendix in variant CJD reported by Hill et al. (1977) and Hilton et al. (1998), respectively. Cerebrum, cerebellum and uncus of other CNS diseases such as ALS, Alzheimer's disease and Parkinson's disease were all negative by immunostaining with MAb#41 which suggested that abnormal accumulation of PrP were not causative agents to these non-prion diseases of CNS.

〔はじめに〕

昨年度の本会議で我々は、ヒト型プリオン蛋白特異的モノクローナル抗体を産生するクローンの作製について報告した。得られたクローン#190は、その後増殖状態が良くなく、抗体の産生も次第に減少していった。今回、新たに得られたクローンは安定して増殖し、かつヒト型プリオン蛋白を特異的に認識し、そのエピトープも解析することができた。これらの成績を報告し、かつ抗体を用いた免疫組織化学的検索により、種々な中枢神経系疾患にプリオン蛋白がどれくらい関与しているのかを併せて検討したので報告する。

〔材料と方法〕

1)モノクローナル抗体の作製手順はこれまでの研究報告に報告されている方法とほぼ同様である。すなわち、pMal プラスミド発現プリオン蛋白 (Mal-PrP) を Balb/c マウスに腹腔内、筋肉内あるいは皮下に Freund's complete adjuvand (FCA)とともに免疫した。PrP を Booster 免疫後、3～4日目に脾細胞と PAI myeloma cell で fusion を行った。免疫抗原は全て北本哲之班長より分与されたものを使用し、細胞融合は型のごとく Kohler and Milstein の方法を一部改良して行った。

使用マウスはすべてエーテル麻酔下にて免疫、脾臓摘出が行われマウスの生命の尊厳は保たれている。

Hybridoma cell のスクリーニングは免疫組織化学法で行った。すなわち、北本らの方法¹⁾に従って、Creutzfeldt-Jacob 病 (CJD)の小脳切片を 6mM の塩酸の存在下で Autoclaving hydrolytic method による前処置をし、培養上清を一次抗体として反応させた。その後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体として反応し、過酸化水素-DAB を基質として発色させた。陽性クローンのサブクローンも同様に免疫組織化学法で行った。陽性サブクローンは、マウス腹腔内に投与し腹水化した。その後、エピトープの検索にはサブクローン#41 および#71 を、PrP の局在などの検索には#41 を主に用いた。

2) #41/71 クローンのエピトープマッピングは以下のように行った。Glutathione-S-transferase (GST) と種々の PrP ペプチド (ヒト、マウス、および両者のキメラ) の融合蛋白を pGEX ベクター (図 1) を用いて大腸菌に発現させた。これら大腸菌の total protein を抗原として、#41/71 クローンまたは抗 GST ヤギポリクローナル抗体を一次抗体とするウエスタンブロットを行い、ヒト PrP アミノ酸配列内の抗原部位を同定した。ウエスタンブロットは、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスまたは抗ヤギ IgG を二次抗体として用い、NBT/BCIP を基質として発色した。

3) 下記の症例についてプリオン蛋白の局在、関与を MAb#41 クローンの腹水を用いて免疫組織学的に検索した。

a) 司法解剖にて供与された 30 例の小脳、大脳を用いた。これらの症例は男性：女性 = 15：15、年齢 [男性：19～83, (平均 61.5 才), 女性：34～85 (平均 62.2 才)] である。

b) 神経内科より供与された ALS 5 例、Alzheimer 病 4 例、Parkinson 病 3 例、MS 1 例、脳血管障害および外傷 4 例 合計 17 例の海馬回を用いた。

c) 国立長崎中央病院より供与された 5 症例の孤発性 CJD では中枢神経組織、内臓組織を用いた

(表1)。5症例は、症例1：64才男性；症例2：68才女性；症例3：55才男性；症例4：70才女性；症例5：75才女性。いずれも臨床的には典型的な PSD がみられている。症例4の母が65才で痴呆症となり66才で死亡している以外に家族歴に特記事項はみられない。

〔結果〕

1) ヒトプリオン蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体3クローンが得られた。このうち増殖および抗体産生能の高い一つのクローンをサブクローンし MAb#41 および MAb#71 を得た。これらのクローンを腹水化し、その抗体をエピトープ・マッピングおよび免疫組織化学に使用した。Protein kinase 処理によるウエスタンブロットでは MAb#41 および#71 は PrPSC 特異的ではなかった。

2) MAb#41/71 のエピトープマッピングでは、GST/ヒト PrP ペプチド融合蛋白を用いたエピトープ解析により、#41/71 両クローンともに、ヒト PrP アミノ酸配列 163-230 を含むヒト PrP ペプチドと反応することが明らかとなった(図2、3)。また、両クローンは、GST/マウス PrP ペプチド 94-230 融合蛋白と全く反応しなかった。マウスの免疫に用いられたストラテジーから判断して、#41/71 クローンはヒト PrP に存在し、マウス PrP に存在しないアミノ酸配列を含む領域にエピトープを持つ可能性が高いと考えられた。ヒト PrP ペプチド 163-230 内で、ヒト/マウス PrP で異なるアミノ酸配列が集まっている領域は以下の3カ所である(図4)。

Locus 1

Human: --P165/M166/D167/E168/Y169--

Mouse: --P164/V165/D166/Q167/Y168--

Locus 2

Human: --C214/I215/T216/Q217/Y218/E219/R220/E221--

Mouse: --C213/V214/T215/Q216/Y217/Q218/K219/E220--

Locus 3

Human: --Y226/Q227/R228/G229/S230-GPI(?)

Mouse: --Y225/D226/G227/R228/R229/S230 — GPI(?)

マウス PrP 内のこれらの領域のどれをヒト型配列で置換した場合に、#41/71 クローンとの反応性が生じるかを、GST/ヒト・マウスキメラ PrP ペプチド融合蛋白を抗原とするウエスタンブロット法を用いて解析した。その結果、上記の Locus 2 をヒト型配列で置換すると、Locus 2・3の両方あるいは Locus 1・2・3の全てをヒト型に置換したペプチドと同様の反応性を獲得することが明らかとなった(図5、6)。このことから、#41/71 クローンのエピトープは、ヒト PrP215-220 を含む領域に存在すると考えられた。

3) MAb#41 を用いた孤発性 CJD の大脳、小脳および脊髄の免疫染色では、プリオン斑、シナップスに一致して特異的に染色された。シナップスでは顆粒状の反応パターンを示したが、たぶんシナップスの断面と考えられる。脊髄では陽性反応がデリケートで微細顆粒状に見られた。これらの所見から、病因との因果関係の証明は困難と考えられる。一部 MAb#41 を用いた免疫電子顕微鏡による観察では毛球状となったプリオン蛋白の異常沈着がみられ、また、海綿状の神経細胞では空胞変性周囲に陽性反応が認められた。

4) 高年齢を含む各年齢層においても神経学的に正常と考えられる30症例の小脳、大脳にプリオン蛋白の異常沈着はみられなかった。また、他の中枢神経系疾患17例の海馬回においても異常蓄積はみられずプリオン蛋白の病因的な関与は示唆されなかった。

〔考察〕

今回得られたモノクローナル抗体 MAb#41 および#71 は、ヒト型プリオン蛋白特異的と考えられるが、Korth 等の報告にあるヒト PrPSC 特異的モノクローナル抗体とは異なる。MAb#41 は、ヒト型プリオン蛋白のアミノ酸 215 から 219-220 のループの部分で認識していると考えられる。この部分のプ

リオン蛋白がどのような機序で異常蓄積に関与しているのかは MAb#41 を用いて今後解析して行きたい。

MAb#41 を用いた免疫組織化学では、CJD の中枢神経組織にプリオン蛋白の異常蓄積が証明された。しかも、免疫電顕法でも海綿状変性を起こした神経細胞の中に、あるいは周囲に反応生成物としてのプリオン蛋白が認められた。したがって、この MAb#41 は、プリオン蛋白の異常蓄積の解析に有用であるのみならず、診断的価値を高く有していると考えられる。しかしながら、孤発性 CJD の全身臓器、とくにリンパ系の脾臓、各所のリンパ節、虫垂、パイエル氏板には陽性反応は見られなかった。Hill³⁾らは variant CJD の扁桃組織の、Hilton⁴⁾らは虫垂の Follicle dendritic cell(FDC)に陽性反応を報告し、免疫組織化学法は発症前の CJD の診断に多大の価値を有していると報告している。孤発性と新型 CJD の違い、用いた抗体の認識部位の差はあるが、MAb#41 を用いた新型 CJD のリンパ系組織の免疫染色は、今後ぜひ行わなければならない。

ヒト型プリオン蛋白特異的モノクローナル抗体は、プリオン病の発生病理の解析に、あるいは診断の一つの方法として有用で、この点を今後の研究方針として進めるつもりである。

〔参考文献〕

- 1) Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T and Tateishi J: Abnormal isoform of prion protein accumulates in the synaptic structure of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am.J.Path.*140:1285-1294, 1992
- 2) Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schultz-Schaeffer W, Kretzschma H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K and Oesch B.: Prion(PrP Sc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature.*390:74-77, 1997
- 3) Hill AF, Zeidler M, Ironside J and Collinge J: Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99-100, 1997
- 4) Hilton DA, Fayers E, Edwards O, Ironside JW and Zajicek J: zprion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 352, 703-704, 1998

〔研究発表〕

2. 学会発表

- 1) 田中智之、北元憲利. ヒトプリオン蛋白に対する特異モノクローナル抗体の性状とプリオン病以外の中枢神経系疾患への関与. 日本ウイルス学会総会、1999

表 1 孤発性CJD 5症例の臨床的背景

	年齢：性	発症から死亡までの期間	PSD	家族歴
症例 1	64 男性	9 カ月	(+)	
症例 2	68 女性	4 年 4 カ月	(+)	
症例 3	55 男性	4 カ月	(+)	
症例 4	70 女性	1 年 6 カ月	(+)	母65才で痴呆症66才で死亡
症例 5	75 女性	1 年 4 カ月	(+)	

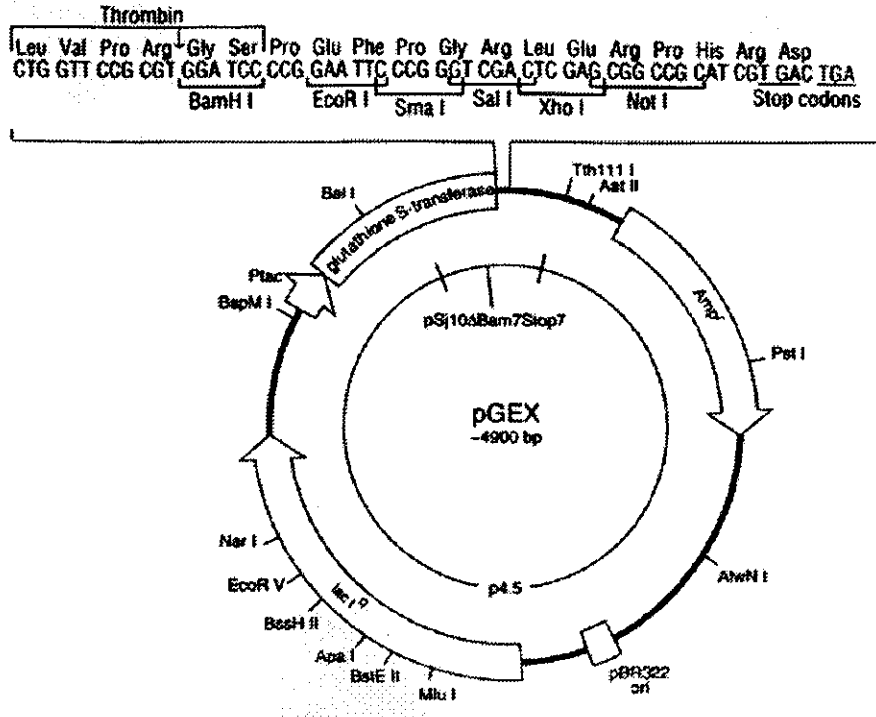


図1. GST/PrPペプチド融合蛋白発現用ベクター pGEX

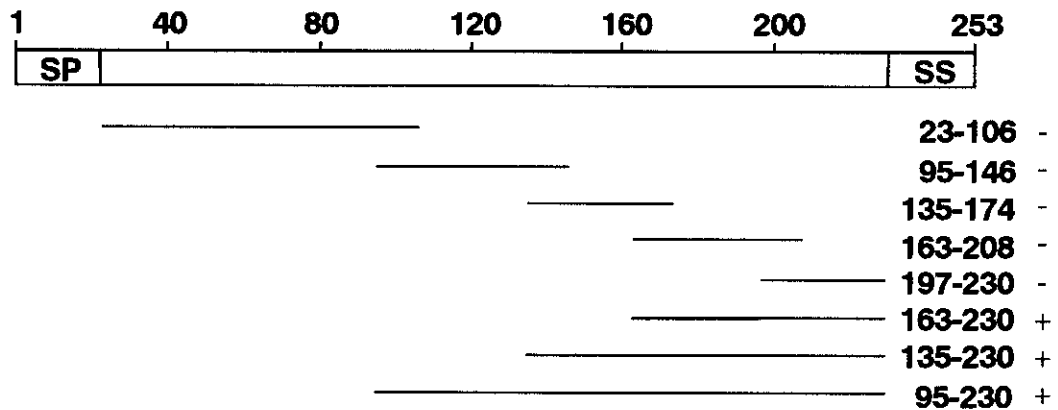


図2. クローン#41/71に対する各種GST/ヒトPrPペプチド融合蛋白の抗原性。数字はPrPペプチドのアミノ酸の番号を示す。図中、一番上に表示してあるのはPrP全長の模式図。その下の水平線は各ペプチドの位置を示す。右端に各ペプチドに対する#41/71クローンの反応性を示す（+は反応、-は無反応）。配列163-230を含むペプチドは抗原性を有している。

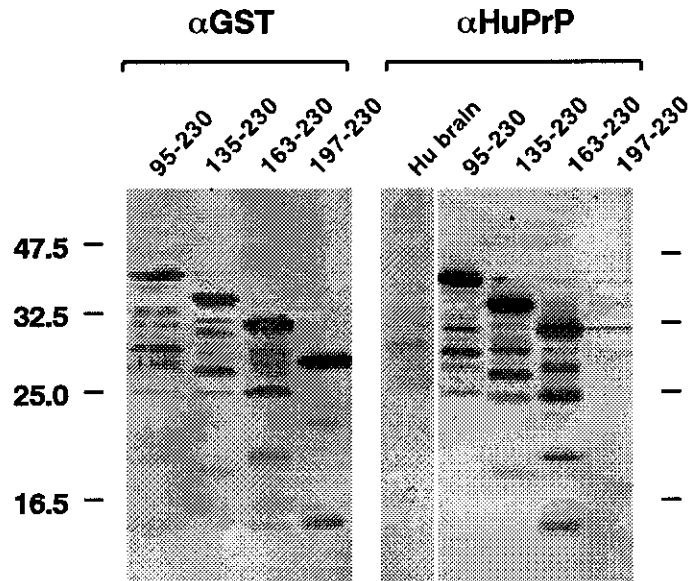


図3. #41クローンとGST/ヒトPrPペプチド融合蛋白を用いたWestern blot。図の左半分は抗GST抗体を用いたWestern blotで、抗原は各種融合蛋白を発現している大腸菌のtotal protein。Blottingの上にある数字はGSTと融合して発現しているヒトPrPペプチドのアミノ酸番号を示す。右半分は同じ抗原およびヒト脳組織乳剤に対する#41クローンの反応。GST/ヒトPrP163-230とは反応しているが、GST/ヒトPrP197-230とは反応していない。#71クローンでも同じ結果が得られた。

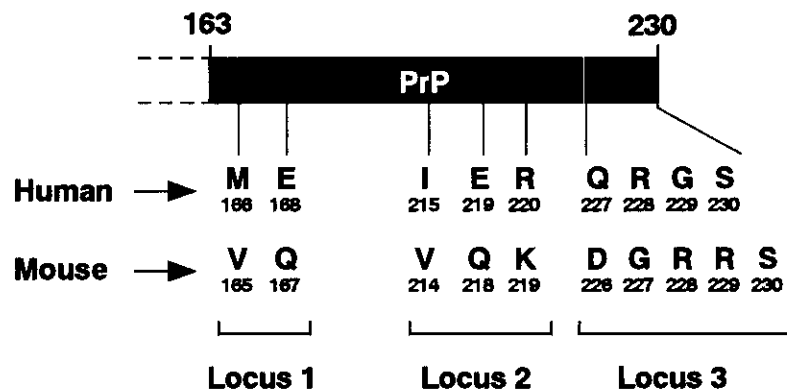


図4. #41/71クローンのエピトープが含まれるヒトPrPペプチド163-230内で、ヒトとマウスPrPのアミノ酸配列が異なる部位。大きく分けて3つの領域 (Locus 1, 2, 3) に配列の違う部位が集まっている。

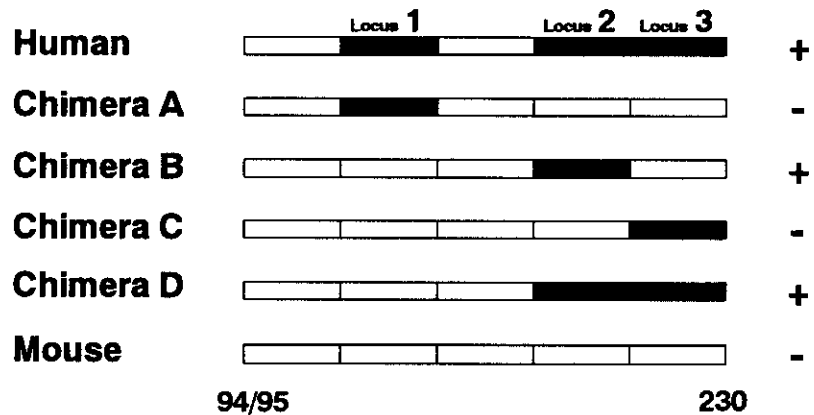


図5. GST/ヒトPrP、GST/マウスPrP、およびGST/ヒト・マウスキメラの各融合蛋白に対する#41/71クローンの反応性のまとめ。図中、棒の白い部分はマウス・ヒトPrPで共通するアミノ酸配列の部位、黒い部分はヒトPrPに特異的な配列の部位（図4のLocus 1, 2, 3）を示す。キメラ融合蛋白では、Locus 1, 2, 3のうち1つまたは2つの領域のマウス型配列をヒト型配列で置換してある。Locus 1, 3の置換ではキメラ蛋白には抗原性（図右端に+/-で示す）は認められない（Chimera A, C）が、Locus 2を置換すると抗原性が生じる（Chimera B, D）。

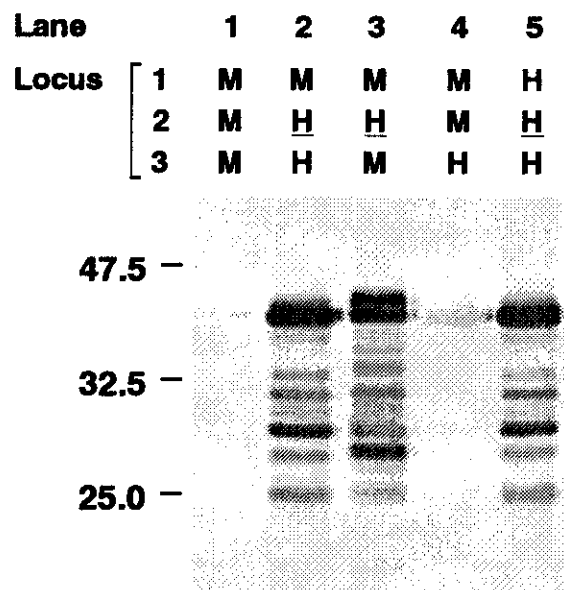


図6. GST/マウスPrP94-230 (lane 1)、GST/ヒトPrP95-230 (lane 5)、GST/マウス・ヒトキメラPrP94-230 (lanes 2, 3, 4)と#71クローンを用いたWestern blot。キメラPrPは、マウスPrPのLocus 2, 3（図3参照）のいずれかまたは両方を、ヒト型配列に置換したものの。陽性反応はLocus 2をヒト型に置換した場合に認められる。#41クローンでも全く同じ結果が得られた。

スクレイピー感染因子の濾過実験

班 員：立石 潤（老人保健施設・春風・Brain Research Laboratory）
班 員：毛利資郎（九州大学・大学院医・動物実験施設）
班 員：北本哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：佐藤 裕（旭化成・プラノバ事業推進部）

[研究要旨]

血液などから TSE 感染因子を除去する方法として我々はフィルター濾過を検討してきた。今回はスクレイピー株 ME7 感染マウス脳をスパイクしたアルブミン溶液、およびそれに 0.5%サルコシルを混じたものを、BMM フィルター孔径 35,15,10nm で濾過した。濾過前および濾過後の溶液を段階希釈し、各 10 匹の C57Bl/6 マウスの脳内に接種し、感染力価を調べた。濾過前のサルコシル -, + 溶液の logID₅₀ は 8.13 と 7.32 で、35nm 濾過後は 3.20 および 5.71、15nm および 10nm 濾過後はいずれも感染は起こらなかった。

Scrapie removal study using membrane filter

Jun TATEISHI¹, Shirou MOHRI², Tetuyuki KITAMOTO³, Sakae SATOH⁴,

¹ Brain Research Laboratory, Geriatric Health Care Facilities, Harukaze

² Laboratory Animal Center, Kyushu University Postgraduate School of Medicine

³ Department of Neurological Science, Tohoku University Postgraduate School of Medicine

⁴ Planova Division, Asahi Chemical Industry

ABSTRACT

Albumin solution was spiked with high titer scrapie ME7 and individually filtered through 3 different pore sizes of PLANOVA[®] filters (35nm, 15nm and 10nm mean pore size). Infectivities of the pre- and post-filtration samples were assayed in log dilution by intracerebral inoculation into C57Bl/6 mice. The filtration of albumin solution in the absence or presence of detergent (Sarkosyl) with 35nm filter proved the removal of contaminating scrapie agent with reduction factors of 4.93 log and 1.61 log, respectively. The filtration both in the absence or presence of detergent with 15nm filter, and in the presence of detergent with 10nm filter showed high levels of scrapie reduction, >5.87 log, >4.21 log and >3.80 log, respectively, with no residual infectivity detected in each sample. The effectiveness of 35nm filtration for the removal of TSE agent is considered to be variable under different sample conditions. The filters with 15nm or smaller mean pore sizes are considered to be more effective means to reduce the risk of TSE contamination.

[はじめに]

ヒトおよび動物の伝達性海綿状脳症 (TSE)の感染因子の不活化は非常に困難であるので、濾過による除去を我々は試みてきた^{1,2)}。最近英国で流行中の牛海綿状脳症 (BSE) およびそれがヒトに感染したと言われる変種 CJD (v-CJD) ではリンパ節にプリオンたんぱく (PrP) が沈着するため³⁾、血液や同製剤からの感染が心配されている。そのためスクレイピー感染因子をフィルター膜により除く大規模な実験を行った。

[目的]

血液などに混入する可能性のあるスクレイピー感染因子をフィルターで濾過する。

[材料と方法]

ヒト血清アルブミン (Sigma) をリン酸緩衝生理食塩水で2%に希釈し、それにスクレイピー ME7 株感染 C57Bl/6 マウス脳乳剤 (エジンバラ AFRC 家畜衛生試験所より入手) を最終的に 1.5% (w/v) になるよう混入した。一部には洗浄剤のサルコシル (Sigma) を最終的に 0.5% になるよう混入した、フィルターは旭化成 (株) 提供の細管状のベンベルグ膜フィルター Planova® の平均孔径 35nm, 15nm, 10nm のものを用い室温、0.3kg/cm² の加圧にて濾過した。濾過前のスクレイピー感染溶液および各フィルターで濾過したもの、またサルコシルを加えた濾過前および後の溶液を段階希釈し、各群 10 匹の C57Bl/6 マウスの右頭頂葉に 0.02ml ずつ接種し、その後 Inveresk Research 社の飼育場にて 20 ヶ月間観察し屠殺した。接種 100 日以降に死亡または屠殺したものを含めて病理標本を作製し、一般染色と共に PrP-N 抗体で免疫染色を行った。20 週以前にスクレイピーの臨床病理所見がなく死亡したマウスは、実験動物数から除外した、感染力価 logID₅₀ は Cavalli-Sforza の方法で算出し、Reduction Factor [感染力価の減少率 = (濾過前の logID₅₀) - (濾過後の logID₅₀)] を計算した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

[結果]

サルコシルを加えない濾過前後の蛋白溶液の感染実験を表1に示す。濾過前の溶液は高い感染力価を示し、陽性コントロールとしても用いられた。発症マウスは体重減少、毛は粗で立毛し、嗜眠傾向、後肢を持ち上げるように背を曲げて歩き、尿失禁のため陰部汚染など、ヒト TSE 感染マウスと同様の症状を呈した。病理所見も同様に海綿状態、アストログリア増生、神経細胞変性などがみられたが、感染性 PrP の蓄積は脳皮質、海馬、視床外側核群などに瀰漫性に沈着するシナプス型の他に、大小の塊状沈着が認められた。空胞形成が弱い段階の脳にも、すでに多量の PrP 沈着が認められ、発病の指標となった。35nm のフィルターを通したものは非希釈液のみ感染性を示し、15nm フィルター濾過液は感染性を示さなかった。

一方サルコシル添加溶液では表2の如く濾過前の溶液の感染力価はやや低いが、35nm フィルター濾過後は 10⁻³ 希釈後も感染性を示した。しかし 15nm, 10nm 濾過後はいずれも非発症であった。

感染力価の減少率(Rf)は表3に示す如く、サルコシル非添加群では高値であったが、添加群ではそれよりも低い傾向があった。しかし両群ともに 15nm および 10nm の濾過液に感染性は認められなかった。

[考察]

以前我々は、ヒト TSE 福岡 1 株感染 NZW マウス脳乳剤の濾過実験を今回と同一のフィルターを用いて行い、すでに報告した^{1,2)}。その際 35nm または、より小さい孔径のフィルターで発症は阻止されたが、洗浄剤のサルコシル添加により感染性が残る傾向がみられた。サルコシルは脳乳剤の濾過膜への付着を防止するか、PrP の凝集を阻止するものと思われる。同じ傾向が今回の実験でも確認され、ヒトと動物の TSE 感染因子の濾過率は近似のものとして推定される。

現在問題になっている輸血または血液製剤による TSE 感染の危険性は、疫学的にヒトでは実証されていないが、CJD 患者血液をマウス脳内に接種することにより実験的伝播に成功し⁴⁾、さらに発病マウス、ハムスターのリンパ球や血小板を同種動物の脳内に接種することで容易に伝播できる^{5,6)}。したがって CJD や v-CJD の血中に TSE 感染が存在し、その量が多ければ末梢性投与によっても感染する危険性は否定出来ない。そのため英国では輸血の際にフィルターによる白血球除去が行なわれているが、その際、白血球の膜片や血小板などの残存が危惧されている⁷⁾。また感染型 PrP は重合して

直径 11nm、長さは平均 165nm (25~550) の桿状構造をとるので⁸⁾、これらの大部分を除去出来る孔径のフィルターを使用すれば血液などの安全性は向上するものと期待出来る。

[結 論]

スクレイピー ME7 株感染マウス脳乳剤を加えたアルブミン溶液を、35nm 以下の孔径のフィルターで濾過することにより、感染力価を大幅に低下または消失させることが出来た。したがってフィルター濾過は血液などからの TSE 感染防止に効果が期待できる。

[参考文献]

- 1) Tateishi J, Kitamoto T, Ishikawa G, Manabe S.: Removal of causative agent of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) through membrane filtration method. *Membrane*.18:357-362, 1993
- 2) Tateishi J, Kitamoto T, Ishikawa G, Manabe S, Yamaguchi K.: Removal of the prion protein using validatable filter (BMMR). In: Beuvery EC et al. *Animal cell technology: Development towards the 21st century*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 637-640, 1995
- 3) Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J: Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet*. 349: 99-100, 1997
- 4) Tateishi J.: Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. *Lancet*.2:1074, 1985
- 5) Kuroda Y, Gibbs CJ Jr, Amyx HL, Gajdusck DC: Creutzfeldt-Jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low density lymphocytes. *Infect Immun*. 41: 154-161, 1983
- 6) Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, et al: The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathies. *Transfusion*. 38: 810-816, 1998
- 7) Prowse CV, Hornsey VS, Drummond O, et al.: Preliminary assessment of whole-blood, red-cell and platelet leucodepleting filters for possible induction of prion release by leucocyte fragmentation during room temperature processing. *Br J Haem*. 106: 240-247, 1999
- 8) Prusiner SB, Baldwin M, Collinge J, DeArmond SJ, Tateishi J, Weissmann C.: Subviral agents: agents of spongiform encephalopathies (Prions). *Arch Virol. Suppl*. 10: 498-503, 1995

[研究発表]

1.論文発表

- 1) Boellaard, J. W., Brown, P., Tateishi, J.: Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease-The dilemma of molecular and clinical correlations. *Clin Neuropathol*. 18: 271-285, 1999

2.学会発表

- 1) Tateishi, J: Creutzfeldt-Jakob disease due to dura mater allografts; epidemiology, case study and prevention. *International workshop on clearance of TSE agents from blood products and implanted tissues*. Sept. 13-14, 1999, Gaithersburg, USA