

平成11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12年 4月10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、棚元 憲一

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

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

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開発検討を行う。

平成11年度（第2年目）は、次のような検討を行った。

1. イムノプロットングにおいて、ウシのプリオンタンパク、ヒトのプリオンタンパク上の異なる部位を認識するウサギ抗血清4種類を得ることができた。また、それらの抗血清及び既存・市販の抗プリオンタンパクモノクローナル抗体について、イムノプロットングにおける反応特性を比較検討した。また、ウシ PrP の C 端付近のペプチドに対する新たなウサギ抗血清を作製した。
2. 動物組織乳剤中の微量プリオンを金属塩により選択的に沈殿できるかを検討した。11種の金属塩の内、硫酸ニッケルがやや有望であったが、以前に検討した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。抗プリオン抗体でコートした磁気ビーズを用い、全く遠心操作を必要としない検出系を作出した。
3. ヒト・グリオーマ細胞株 T98G におけるプリオンタンパクの発現量および細胞内分布は、その培養条件下の細胞密度に依存し、細胞周期には依存しないことを見いだした。また、プリオンタンパクの部分ペプチドが、プリオンタンパクの発現を一過性に誘導した。以上の結果から、正常プリオンタンパクの発現および細胞内分布は、細胞間相互作用により制御され、細胞表面のプリオンタンパクが関与していることが示唆された。

分担研究者

| | |
|-------|---|
| 品川 森一 | 帯広畜産大学・ 獣医公衆衛生学教室 教授 |
| 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 (平成11年4月1日～6月30日) |
| 棚元 憲一 | 国立医薬品食品衛生研究所・ 衛生微生物部 部長 (平成11年7月1日～ 平成12年3月31日) |

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。異常プリオンタンパクに汚染された外国産原材料が輸入され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、医用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。そのため、高感度のアッセイ法が求められる。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、医用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。

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（PrP^{Sc}）の、食品、医薬品、医用材料、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

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することをめざす。

B. 研究方法

1. 抗プリオンペプチド抗体の反応特性の解析と新規抗体の作製

抗 PrP 抗血清の作製：

ウシ、ヒトのプリオンタンパク (PrP) の中央付近および 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 および白色在来種) に免疫した。得られた抗血清の抗体価を、ペプチド-OVA を固相抗原にして ELISA で測定した。

イムノブロットティング：

各種抗 PrP 抗体 (作製した抗血清および既存・市販の抗 PrP モノクローナル抗体) について、ホルスタイン種系ウシ脳 P2 画分、ヒトグリオーマ細胞株 T98G の膜画分、SD ラット大脳膜画分、BALB/c マウス脳膜画分を試料としたイムノブロットティングを行った。HRP 標識 2 次抗体を用いた化学発光法、または、ALP 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濃縮方法の開発

金属塩によるプリオン沈殿：

スクレイピー感染マウス脳乳剤を正常脳乳剤で希釈したものをモデル試料とした。各種金属塩を単独あるいは 20 mM MgCl₂ と共に試料に加え、沈殿蛋白量の比較と、プリオンの回収量を比較した。プリオン構成タンパク PrP^{Sc} は段階希釈を行ってイムノブロットティングにより半定量的に検出した。

磁気ビーズ法：

ウサギ抗 PrP 抗体 IgG 画分を結合させた磁気ビーズ、および、ビオチン化したウサギ抗 PrP 抗体 IgG 画分を調製した。部分精製プリオン画分及び感染脳乳剤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した。磁気ビーズへのプリオンの吸着は、SDS 溶出後イムノブロットティングで定量した。系全体を評価する場合はペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い発色により測定した。

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

イムノブロットティング：

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G を培養後、全細胞溶解液を調製し、SDS-PAGE で分離後、PVDF 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トティングを行い、化学発光法でプリオンタンパクを検出した。

蛍光抗体法：

カバーガラス上で T98G 細胞を培養後、固定し、0.2% Triton X-100 で処理した。次に、1 次抗体としてヤギ抗ヒト・プリオン抗血清を、2 次抗体として Alexa 488 標識ウサギ抗ヤギ Ig を用いて間接蛍光抗体法による染色を行い、蛍光顕微鏡でプリオンタンパクの細胞内分布を調べた。

免疫電顕法：

カバーガラス上で T98G 細胞を培養後、固定し、0.2% Triton X-100 で処理した。次に、1 次抗体としてヤギ抗ヒト・プリオン抗血清を、2 次抗体として金コロイド標識ウサギ抗ヤギ Ig を用いて免疫電顕法による染色を行い、電子顕微鏡でプリオンタンパクの細胞内分布を調べた。

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

昨年度、ウシ、ヒトの各 PrP の中央付近および C 端付近のペプチド (Bovine PrP(104-123)、bovine PrP(225-241)、human PrP(95-114)、human PrP(214-230)) を抗原として、ウサギの抗プリオンペプチド抗血清を作製した。今年度はそれら抗血清について、ウシ、ヒト、ラット、マウスの PrP^C に対するイムノブロットティングでの反応性を調べた。その結果、これら 4 種類の抗血清は、ウシ PrP^C にもヒト PrP^C にも反応した。従って、イムノブロットティングにおいてウシ PrP^C 上の異なるエピトープを認識する 4 種類のウサギ抗血清を得ることができた。今後、アフィニティークロマトグラフィーによる抗血清の精製を行う予定である。

ウシ PrP の C 端付近のペプチド (Bovine PrP(217-236)、Bovine PrP(226-238)) に対するウサギ抗血清を新たに作製し、抗原ペプチドに反応する抗血清を得ることができた。現在、PrP のイムノブロットティングによる解析を進めている。

上述のウサギ抗 PrP 抗血清 4 種類、ウシ PrP と反応することが報告されているマウスモノクローナル抗体 3 種類、ヒト PrP と反応することが報告されているマウスモノクローナル抗体 2 種類について、イムノブロットティングにおける反応性を比較した。いずれの抗体を用いた場合でも、PrP^C の 3 本のバンドの内、最も分子量の大きなバンドが最も濃く検出されることは共通していたが、上から 2 本目、3 本目のバンドの相対強度は、抗体によ

って異なっていた。これは、PrP分子上のN-glycansの本数が、イムノブロットングにおける抗PrP抗体の反応性に影響を与えていることを示唆している。

2. 医薬品・化粧品関連原材料中の微量汚染プリオンの濃縮方法の開発

金属塩によるプリオン沈殿:

11種類の金属塩の内、ニッケル硫酸塩がMgイオンの存在下でもっと夾雑タンパクが少なくプリオンが沈殿した。しかし、すでに開発した食塩存在下におけるポリエチレングリコール沈殿に比べ、はるかに夾雑タンパク量が多かった。

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わかった。そこで、試料調製法の検討を行った結果、酵素処理が終わった試料を1% Sarkosyl, 20 mM MgCl₂, 1 M NaCl 存在下で100°C 30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わかった。

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

昨年度、T98G細胞におけるプリオンタンパクの発現が、その細胞密度に依存し、細胞から放出されるautocrine factorsは発現に関与しないことを報告した。そこで、接触阻止がかかった細胞の多くは休止期にあることから、T98G細胞において、細胞周期のプリオンタンパク発現への影響を検討した。高細胞密度で培養した定常期の細胞と比較して、対数増殖期および休止期の低細胞密度下の細胞のプリオンタンパク発現量は約60%で、共に低かった。

次に、蛍光抗体法および免疫電顕法でプリオンタンパクの細胞内分布を検討した。プリオンタンパクの発現は、低細胞密度下では核周辺に局在し、接触阻止がかかった細胞では核周辺および細胞膜上に広く存在していた。

また、ヒト・プリオンタンパクの部分ペプチドhPrP(106-126)が、T98G細胞のプリオンタンパク発現に及ぼす影響を、イムノブロット法で調べた。hPrP(106-126)を加えて低細胞密度下で1日間培養したT98G細胞は、16日間培養した高密度下のT98G細胞の約90%のプリオンタンパク発現量を示した。しかし、hPrP(106-126)を加えて4日間培養したT98G細胞では、プリオンタンパクの発現量は低く、ペプチド非存在下で培養した低細胞密度の細胞と有意差はなかった。従って、hPrP(106-126)ペプチドのプリオンタンパク発現誘導作用は一過性であると考えられる。

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、試料中の極微量のプリオンを濃縮する方法の開発と、さらに検出感度を向上させる必要がある。

イムノアッセイの一層の高感度化に必要な反応特性のすぐれた抗体をめざして、新たな抗体の作製と既存抗体の比較検討を行った。その結果、ウシPrP^C、ヒトPrP^Cのイムノブロットングに使用できるウサギ抗血清を得ることができた。これらの抗血清は、PrP^Cのイムノブロットングに使用できたことから、タンパク変性剤で変性させたPrP^{Sc}のイムノブロットングにも利用できると推測される。今後、抗PrP抗血清のアフィニティー精製を行って得られる精製ポリクローナル抗体及び既存・市販の抗PrPモノクローナル抗体を用いて、医薬品等原材料中のBSE病原体の汚染を想定した高感度ELISAの検討を行う。

各種抗PrP抗体を用いて、ウシPrP^CとヒトPrP^Cのイムノブロットングで検出されるバンドのパターンを比較すると、抗体によってPrP^Cの3本のバンドの相対強度のパターンに違いが見られた。こうした抗PrP抗体の反応特性の違いは、抗PrP抗体を使ってPrPの定量を行う場合には十分考慮する必要がある。

試料中の極微量のプリオンを濃縮する方法の開発を目的に、金属塩を用いたプリオン沈殿と磁気ビーズを用いたプリオン検出法を検討した。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、共存するタンパク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、濃度等の検討がさらに必要である。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。試料調製の方法を改変することによりある程度克服できたが、さらに条件検討を行い、実用的方法を確立したい。

細胞培養系を用いたin vitro バイオアッセイ法の開発をめざして、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制御の解析を行った。T98G細胞のプリオンタンパクの発現量は細胞密度に依存し、高細胞密度下では高い発現量を示した。しかし、休止期の細胞と対数増殖期の細胞での発現量に有意差はなく、細胞周期には依存しなかった。また、昨年度報告したように、T98G細胞の産生するautocrine factorsはプリオンタンパ

クの発現を誘導しない。さらに、神経毒性があるとされているヒト PrP ペプチド hPrP (106-126)は、細胞密度下の T98G 細胞に対して、一過性にプリオンタンパクの発現を誘導した。以上の結果より、T98G 細胞表面のプリオンタンパクは、近傍の細胞同士の接着により相手の細胞表面にあるプリオンタンパク結合分子と相互作用し、その細胞でのプリオンタンパク発現の調節に関与していると推定される。

今回の実験に用いたペプチド hPrP (106-126)は、その立体構造が異常プリオンタンパクと類似しているとの報告がある。T98G 細胞がこのペプチドに反応してプリオンタンパクの発現が誘導されたことから、異常プリオンタンパクも T98G 細胞でのプリオンタンパクの発現を誘導する、あるいは何らかの生理作用を及ぼす可能性がある。そこで、T98G 細胞におけるプリオンタンパクの生理作用を調べ、その反応を検出することにより、異常プリオンタンパクの迅速な *in vitro* バイオアッセイ法を開発できる可能性が今後期待できる。

E. 結論

1. イムノブロットングにおいて、ウシのプリオンタンパク、ヒトのプリオンタンパク上の異なる部位を認識するウサギ抗血清 4 種類を得ることができた。また、それらの抗血清及び既存・市販の抗プリオンタンパクモノクローナル抗体について、イムノブロットングにおける反応特性を比較検討した。また、ウシ PrP の C 端付近のペプチドに対する新たなウサギ抗血清を作製した。
2. 動物組織乳剤中の微量プリオンを金属塩により選択的に沈殿できるかを検討した。11 種の金属塩の内、硫酸ニッケルがやや有望であったが、以前に検討した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。抗プリオン抗体でコートした磁気ビーズを用い、全く遠心操作を必要としない検出系を作出した。
3. ヒト・グリオーマ細胞株 T98G におけるプリオンタンパクの発現量および細胞内分布は、その培養条件下の細胞密度に依存し、細胞周期には依存しないことを見いだした。また、プリオンタンパクの部分ペプチドが、プリオンタンパクの発現を一過性に誘導した。以上の結果から、正常プリオンタンパクの発現および細胞内分布は、細胞間相互作用により制御され、細胞表面のプリオンタンパクが関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

2. Nemoto, T, Horiuchi, M, Ishiguro, N, Shinagawa, M. Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch Virol* 143:1-8, 1999
3. 品川森一 動物のプリオン病, 宮城獣医師会会報 52:121-131, 1999.
4. 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

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、山崎壯、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、山崎壯、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）
4. 山崎壯、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）
5. 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)
6. 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)
7. 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

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

－ウシプリオンタンパクの高感度イムノアッセイ法の開発－

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

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、ウサギによるポリクローナル抗体の作製を行った。その結果、ウシ PrP 部分ペプチドおよびヒト PrP の部分ペプチドを抗原として作製した 4 種類の抗 PrP ペプチド抗血清が、ウシ脳由来の正常 PrP のイムノブロットングに使用できることを確認した。さらに、それらの抗血清及び既存・市販の抗 PrP モノクローナル抗体について、イムノブロットングにおける抗体の反応性を比較検討し、PrP の 3 本のバンドの相対強度が抗体によって違うことが判明した。また、新たなペプチドを用いて、ウシ PrP の C 端付近のペプチドに対する抗血清の作製を行った。

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、医用材料、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。医原性プリオン感染を防ぐためには、医薬品、医用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。

昨年度、プリオンタンパクに対するウサギ抗血清を作製し、それらがウシ脳由来の PrP^C に反応することを確認した。今年度は、それらの作製した抗血清を、既存および市販の抗プリオンタンパク抗体と共に、イムノブロットングにおける抗体の反応性を比較検討した。また、新たなペプチドを用いて、ウシ PrP の C 端付近のペプチドに対する抗血清の作製を行った。

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中央付近および 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。

抗原#1:

Bovine PrP(104-123)-Cys-HSA

[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#10:

Bovine PrP(217-236)-HSA

[Ac-MERVVEQMCITQYQRESQAY-CONH₂]

(Cys225 を介して HSA に結合)

抗原#11:

Bovine PrP(226-238)-Cys-HSA

[Ac-MITQYQRESQAYYQC]

抗原#1~#4 をウサギ (NZW) に 6 回免疫した。また、抗原#10 と#11 をウサギ (白色在来種) 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。

2. イムノブロッティング

PrP^C を含む試料として、以下のものを使用した。ウシ PrP^C: ホルスタイン種系ウシ脳 P2 画分; ヒト PrP^C: ヒトグリオーマ細胞株 T98G の膜画分; ラット PrP^C: SD ラット大脳膜画分; マウス PrP^C: BALB/c マウス脳膜画分。

PrP^C を含む試料の SDS-PAGE (+2ME) を行った後、イムノブロッティングを行った。1 次抗体として、ウサギ抗血清またはマウスモノクローナル抗体を用いた。HRP 標識 2 次抗体を用いた化学発光法 (ECL Plus、Amersham Pharmacia

Biotech 社)、または、ALP 標識 2 次抗体を用いる発色法 (Immun-Blot Kit、Bio-Rad 社) で検出した。

3. 抗 PrP モノクローナル抗体

以下のモノクローナル抗体を使用した。

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)、34C9 (抗 PrP、認識部位は Human PrP(144-152)、ウシ PrP とも反応、Prionics 社)、6H4 (抗ウシ PrP、認識部位は Bovine PrP(149-153)、Prionics 社)、3F4 (抗 Human PrP、認識部位は Human PrP(109-112)、Senetek 社)。

C. 研究結果

1. 抗プリオンペプチド抗血清の作製と反応性の解析

1. 1. ポリクローナル抗体の反応性の解析

昨年度、ウシ、ヒトの各 PrP の中央付近および C 端付近のペプチド (ペプチド BPN、BPC、HPN、HPC) を抗原として、ウサギの抗プリオンペプチド抗血清の作製を行った。その結果、抗ウシプリオンペプチド抗血清 (抗 BPN 抗血清)、抗ヒトプリオンペプチド抗血清 (抗 HPN 抗血清) が、イムノブロッティングにおいてウシ脳由来の PrP^C に反応することがわかった。今年度はそれら抗血清の反応性についてさらに解析を進めた。

抗 BPN 抗血清、抗 BPC 抗血清、抗 HPN 抗血清、抗 HPC 抗血清について、ウシ、ヒト、ラット、マウスの PrP^C 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、これら 4 種類の抗血清は、ウシ PrP^C とヒト PrP^C に共に反応した (Figs. 1, 2)。イムノブロッティングで検出されたバンドのパターンを比較すると、ウシ PrP^C とヒト PrP^C の 3 本のバンド (上から N-glycans を 2 本、1 本、0 本もつ PrP^C 分子に相当) の相対強度が抗血清の種類によって異なっていた。

なお、ラットとマウスの PrP^C に対しては、抗 BPN 抗血清、抗 HPN 抗血清がイムノブロッティ

ングで弱く反応したが、実用には適さない。

今回の抗血清作製で、イムノブロットィングにおいてウシ PrP^C 上の異なるエピトープを認識する4種類のウサギ抗血清を得ることができた。今後組換え PrP または PrP ペプチドをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによる抗血清の精製を行う予定である。

1. 2. ウシ PrP の C 端付近のペプチドに対する抗血清の作製

ウシ PrP の C 端付近のペプチド(抗原#10、#11)に対する抗血清を新たに作製した。得られた抗血清について、ペプチド-OVA を固相抗原にした ELISA で測定した結果、抗原ペプチドに反応する抗血清(抗体価 $5 \times 10^4 - 8 \times 10^4$)を得られたことが確認できた。現在、イムノブロットィングによる解析を進めている。

2. 抗 PrP モノクローナル抗体のイムノブロットィングにおける反応性の比較

ウシ PrP と反応することが報告されているマウスモノクローナル抗体3種類(BSPX-54、34C9、6H4)とヒト PrP と反応することが報告されているマウスモノクローナル抗体2種類(3F4、6H4)について、イムノブロットィングにおける反応性を比較した。

抗ウシ PrP 抗体によるイムノブロットィングで検出されたバンドのパターンを比較すると、ウシ PrP^C の3本のバンドの相対強度が抗体の種類によって一部異なっていた(Fig. 3)。抗ヒト PrP 抗体によるヒト PrP^C のイムノブロットィングでも同様の結果が得られた。

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、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

の作製と既存抗体の比較検討を行った。その結果、ウシ PrP、ヒト PrP に対するウサギ抗血清を得ることができ、PrP^C のイムノブロットィングに使用できることを確認した。また、抗 BPN 抗血清、抗 HPN 抗血清については、ウシ脳から界面活性剤 CHAPS で可溶化した PrP^C、及び、タンパク変性剤で変性させたウシ脳 PrP^C を免疫沈降できることをすでに確認している。従って、PrP^C のイムノブロットィングと免疫沈降に利用可能な抗 PrP 抗血清が得られた。これらの抗血清は、PrP^C のイムノブロットィングに使用できたことから、タンパク変性剤で変性させた PrP^{Sc} のイムノブロットィングにも利用できると推測される。

我々の作製した抗 PrP 抗血清および既存・市販の抗 PrP モノクローナル抗体を用いて、ウシ PrP^C とヒト PrP^C のイムノブロットィングで検出されるバンドのパターンを比較した。その結果、抗体によって PrP^C の3本のバンドの相対強度のパターンに違いのあることがわかった。いずれの抗体を用いた場合でも、最も分子量の大きなバンドが最も濃く検出されることは共通していたが、上から2本目、3本目のバンドの相対強度は、抗体によって異なっていた。これは、PrP 分子上の *N*-glycans の本数が、イムノブロットィングにおける抗 PrP 抗体の反応性に影響を与えていることを示唆している。こうした抗 PrP 抗体の反応特性の違いは、抗 PrP 抗体を使って PrP の定量を行う場合には十分考慮する必要がある。

次年度は、これまでに得られた抗 PrP 抗血清のアフィニティー精製を行う。さらに、それらの精製ポリクローナル抗体及び既存・市販の抗 PrP モノクローナル抗体を用いて、医薬品等原材料中の BSE 病原体の汚染を想定した高感度 ELISA の検討を行う。

E. 結論

平成 11 年度は、昨年度作製したプリオンタンパクに対する 4 種類のウサギ抗血清がウシ PrP^C とヒト PrP^C に反応し、イムノプロットィングに使用できることを確認した。さらに、それらの抗血清及び既存・市販の抗 PrP モノクローナル抗体について、イムノプロットィングにおける抗体の反応性を比較検討し、PrP^C の 3 本のバンド間での相対検出感度が抗体によって違いのあることを示した。また、ウシ PrP の C 端付近のペプチドに対する抗血清を新たに作製した。

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、山崎壯、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、山崎壯、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）
3. 山崎壯、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）

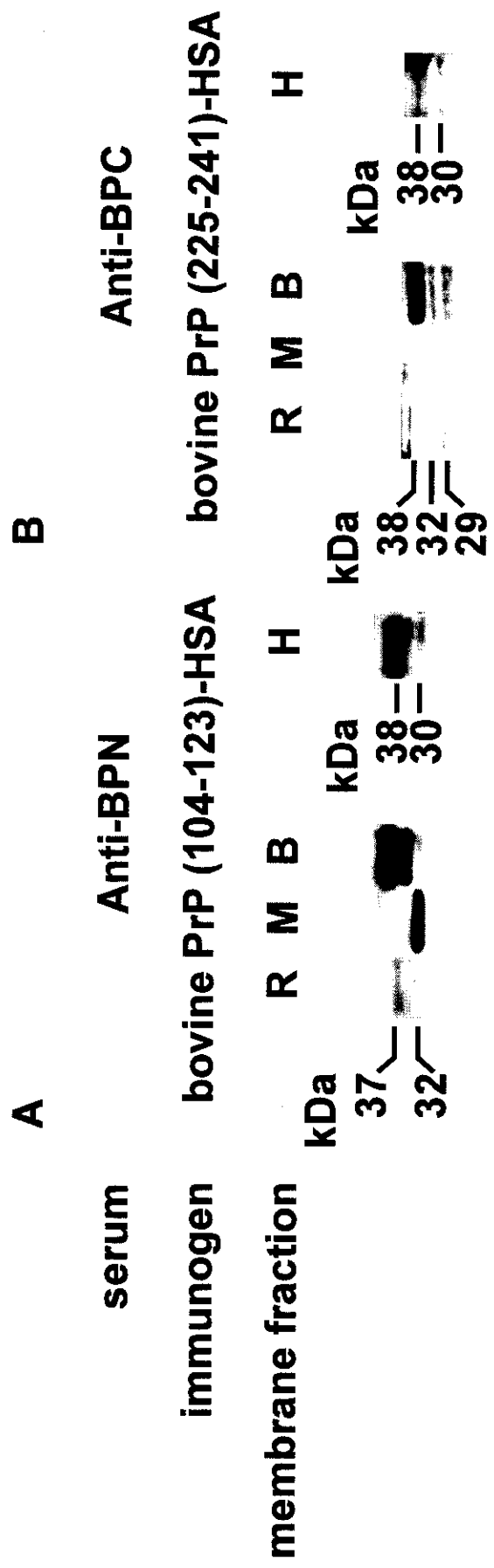


Fig. 1 Reactivity of rabbit anti-bovine PrP peptide sera

R, rat; M, mouse; B, bovine; H, human



Fig. 2 Reactivity of rabbit anti-human PrP peptide sera

R, rat; M, mouse; B, bovine; H, human

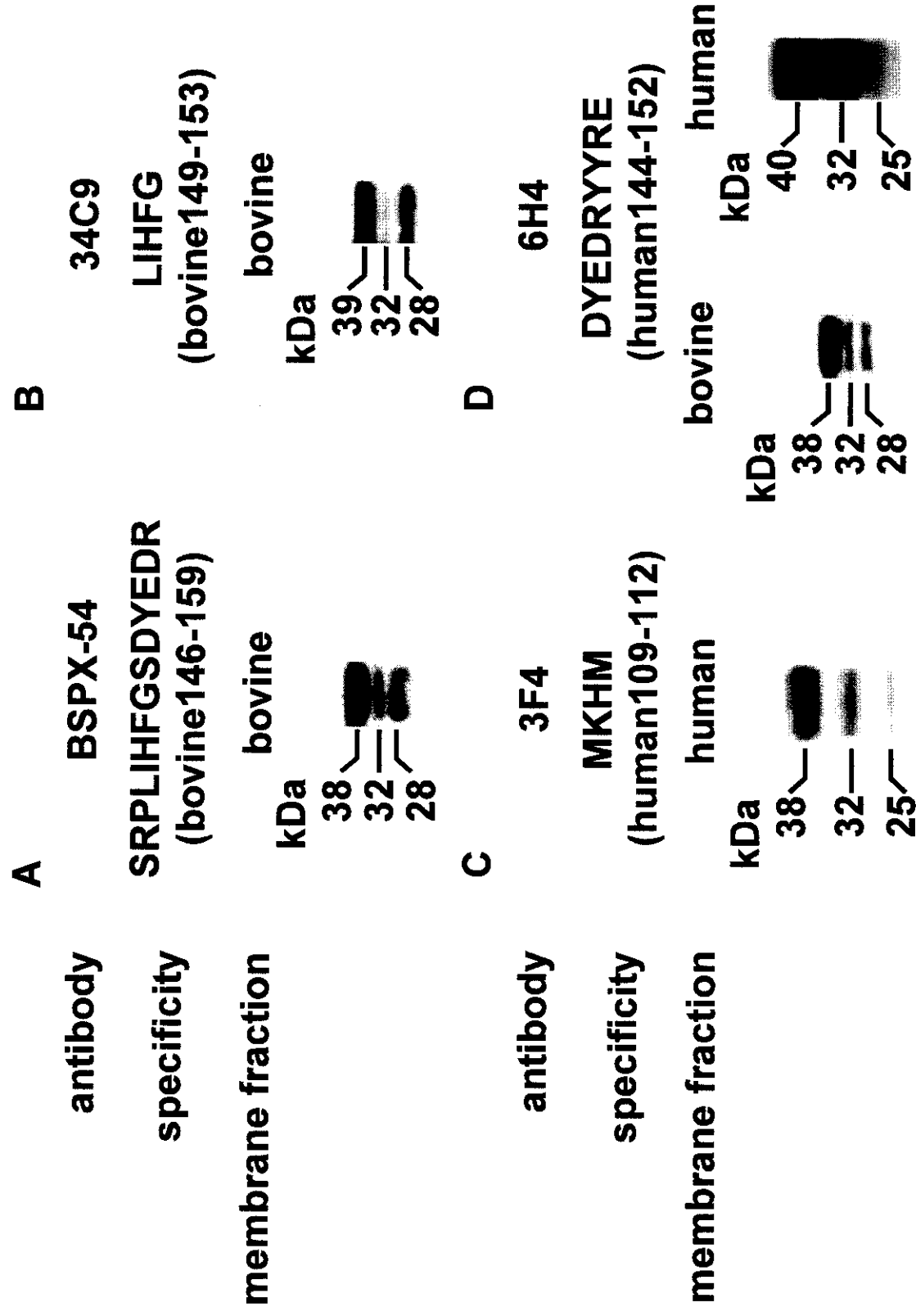


Fig. 3 Reactivity of monoclonal antibodies against PrP peptides

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

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製法の開発

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

1) 動物組織乳剤中の微量プリオンを金属塩により選択的沈殿が可能か検討した。11種の金属塩の内、硫酸ニッケルがやや有望である以外、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、以前に検討した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を作出した。部分精製した試料では使用可能であったが、生体組織から調製した粗抽出物を対象とした場合、反応が強く抑制され、試料調製法の検討が必要なことが判った。

A. 研究目的

医薬品・化粧品関連原材料中の汚染プリオンを検出するための、試料調製法を開発することを目的とする。

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、クロム酸カリウム、重クロム酸カリウム、塩化第1スズ、硫酸銅、酢酸鉛、硫酸マンガ、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20 mM $MgCl_2$ 存在下に、0.5%までの各種溶液に添加した。4°Cに放置後遠心し、沈殿蛋白量の比較と、プリオンの回収量を比較した。プリオン構成蛋白 PrP^{Sc} は段階希釈を行ってウエスタンブロットにより半定量的に検出した。

磁気ビーズ法：ウサギ抗 PrP 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 PrP 抗体 IgG 画分をビオチン化したものを用意した。部分

精製プリオン画分及び感染脳乳剤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した。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レプトアビジンを用い発色により測定した。

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、すでに開発した食塩存在下における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。試料調製法の検討を行い、酵素処理が終わった試料を1% Sarkosyl、20 mM $MgCl_2$ 、1 M NaCl 存在下で100°C 30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。

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、濃度等の検討が必要であり、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。ある程度試料調製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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 bicine-PrP-peptides. *J Neurovirol* 5: 300-307, 1999
2. Nemoto, T, Horiuchi, M, Ishiguro, N, Shinagawa, M. Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch Virol* 143:1-8, 1999
3. 品川森一 動物のプリオン病, 宮城獣医師会会報 52:121-131, 1999.
4. 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

1. 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)
2. 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)
3. 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（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」

－培養細胞を用いたプリオンタンパクの *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
(平成 11 年 4 月 1 日－6 月 30 日)

棚本 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長
(平成 11 年 7 月 1 日－平成 12 年 3 月 31 日)

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と考えられており、発症における異常プリオンタンパク質の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機能及び細胞内での動態は未だに解明されていない。平成 10 年度では、T98G 細胞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、細胞から放出される autocrine factors は発現に関与しないことを報告した。そこで、接触阻止がかかった細胞の多くは休止期にあることから、T98G 細胞での正常プリオンタンパク質の発現に対する細胞周期の影響を検討した。T98G 細胞を低細胞密度で培養し、対数増殖期の細胞及び血清非存在下で休止期 (G1/G0) に誘導した細胞から全細胞溶解液を調製し、抗ヒト・プリオンタンパク質抗体 3F4 を用いたイムノプロット法で発現量を比較した。その結果、プリオンタンパク質の発現量に有意差はなかった。蛍光抗体法及び免疫電顕法でプリオンタンパク質の細胞内分布を検討したところ、低細胞密度下では核周辺に局在し、接触阻止がかかった細胞では核周辺および細胞膜上に広く存在していた。また、T98G 細胞に対する、ヒト・プリオンタンパク質のアミノ酸配列 106-126 残基に相当する合成ペプチド hPrP (106-126) の影響を調べたところ、プリオンタンパク質の発現を一過性に誘導した。以上の結果から、正常プリオンタンパク質の発現および細胞内分布は、細胞間相互作用により制御されていることが示唆された。

A. 研究目的

プリオン病は、神経が脱落して脳がスポンジ状になる病気で、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病やクールー病、ヒツジのスクレイピー、ウシの海綿状脳症（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と考えられており、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

可能性も指摘されているが、未だに正常プリオンタンパク質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ている。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シスが認められている。

平成 10 年度は、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、ヒト培

養細胞株の中からプリオンタンパク質を恒常的に発現している細胞株を探索した。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ない、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G が、その細胞密度に依存して正常プリオン・タンパク質を発現していることを報告した。

本年度は T98G 細胞を用い、プリオンタンパク質発現における、細胞周期の関与、プリオンタンパク質の細胞内分布、およびプリオンタンパク質合成ペプチドの影響を調べた。

B. 研究方法

イムノプロット法

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G を培養後、全細胞溶解液を調製し、SDS-PAGE で分離後、PVDF 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法を行い、化学発光法でプリオンタンパク質を検出した。

蛍光抗体法

カバーガラス上で T98G 細胞を培養後、3.7%ホルマリン-0.25%グルタルアルデヒドで固定し、0.2% Triton X-100 で処理した。次に、1次抗体としてヤギ抗ヒト・プリオン抗血清を、2次抗体として Alexa 488 標識ウサギ抗ヤギ Ig を用いて間接蛍光抗体法による染色を行い、蛍光顕微鏡でプリオンタンパク質の細胞内分布を調べた。

免疫電顕法

カバーガラス上で T98G 細胞を培養後、3.7%ホルマリン-0.25%グルタルアルデヒドで固定し、0.2% Triton X-100 で処理した。次に、1次抗体としてヤギ抗ヒト・プリオン抗血清を、2次抗体として金コロイド標識ウサギ抗ヤギ Ig を用いて免疫電顕法による染色を行い、電子顕微鏡でプリオンタンパク質の細胞内分布を調べた。

C. 研究結果

平成 10 年度に、T98G 細胞におけるプリオンタンパク質の発現が、その細胞密度に依存し、細胞から放出される autocrine factors は発現に関与しないことを報告した。そこで、接触阻止がかかった細胞の多くは休止期にあることから、T98G 細胞において、細胞周期のプリオンタンパク質発現への影響を検討した。T98G 細胞を低細胞密度で培養し、血清存在下で対数増殖期にある細胞 (0.4×10^5 cells/cm²) 及び血清非存在下で休止期 (G1/G0) に誘導した細胞 (0.3×10^5 cells/cm²)

(Fig. 1) からそれぞれ全細胞溶解液を調製した。糖鎖切断酵素でプリオンタンパク質の N-グリコシド型糖鎖を切断した後、抗ヒト・プリオンタンパク質抗体 3F4 を用いたイムノプロット法を行い (Fig. 2)、デンストメーターで 25 kDa のプリオンタンパク質の発現量を比較した。高細胞密度で培養した定常期の細胞 (1.8×10^5 cells/cm²) に比較して、対数増殖期および休止期の低細胞密度下の細胞のプリオンタンパク質発現量は約 60%で、共に低かった。

次に、蛍光抗体法でプリオンタンパク質の細胞内分布を検討した。プリオンタンパク質の発現は、低細胞密度下では核周辺に局在し、接触阻止がかかった細胞では核周辺および細胞膜上に広く存在していた (Fig. 3)。さらに、金コロイドを用いた免疫電顕法を行った検討でも、蛍光抗体法と同様なプリオンタンパク質の発現と局在を確認した。

また、ヒト・プリオンタンパク質のアミノ酸配列 106-126 残基に相当する合成ペプチド hPrP (106-126) が、T98G 細胞のプリオンタンパク質発現に及ぼす影響を、イムノプロット法で調べた (Fig. 4)。hPrP (106-126) を培地に加え ($0.52 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{g/ml}$)、低細胞密度下で 1 日間培養した T98G 細胞 (0.5×10^5 cells/cm²) は、16 日間培養した高密度下の T98G 細胞 (1.1×10^5 cells/cm²) の約 90% のプリオンタンパク質発現量を示した。しかし、hPrP (106-126) ($0.52 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{g/ml}$) を培地に加

えて 4 日間培養した T98G 細胞 (0.3×10^6 cells/cm²) では、プリオンタンパク質の発現量は低く、ペプチド非存在下で培養した低細胞密度の細胞と有意差はなかった。その値は高密度下の T98G 細胞 (1.1×10^6 cells/cm²) の約 50% だった。従って、hPrP (106-126) ペプチドのプリオンタンパク質発現誘導作用は一過性であると考えられる。

D. 考察

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G の全細胞溶解液に、イムノプロット法により正常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量は細胞密度に依存し、高細胞密度下では高い発現量を示した。しかし、休止期の細胞と対数増殖期の細胞での発現量に有意差はなく、細胞周期には依存しなかった。また、昨年度報告したように、T98G 細胞の産生する autocrine factors はプリオンタンパク質の発現を誘導しない。以上より、プリオンタンパク質の発現は細胞間相互作用により調節されていると推定した。

さらに、神経毒性があるとされているヒトプリオンタンパク質の 106-126 残基に相当するペプチド hPrP (106-126) の作用を調べた。低細胞密度下の T98G 細胞に対して、hPrP (106-126) は一過性にプリオンタンパク質の発現を誘導した。

以上の結果より、T98G 細胞表面のプリオンタンパク質は、近傍の細胞同士の接着により相手の細胞表面にあるプリオンタンパク質結合分子と相互作用し、その細胞でのプリオンタンパク質発現の調節に関与していると推定される。

今回の実験に用いたペプチド hPrP (106-126) は、その立体構造が異常プリオンタンパク質と類似しているとの報告がある。T98G 細胞がこのペプチドに反応してプリオンタンパク質の発現が誘導されたことから、異常プリオン蛋白質も T98G 細胞でのプリオンタンパク質の発現を誘導する、あるいは何らかの生理作用を及ぼす可能性がある。そこで、T98G 細胞におけるプリオンタンパク質の

生理作用を調べ、その反応を検出することにより、異常プリオンタンパク質の迅速な *in vitro* バイオアッセイ法を開発できる可能性が高い。また、プリオン病の動物及びヒトのグリア細胞では異常プリオンタンパク質の発現が高いことが知られている。T98G 細胞に異常プリオンタンパク質を *in vitro* で伝達することが可能ならば、プロテアーゼ抵抗性を利用したイムノプロット法などの免疫化学的手法による異常プリオンタンパク質の検出法になることが期待できる。

現在、異常プリオンタンパク質のバイオアッセイは、マウスやハムスターの脳内に異常プリオンタンパク質を投与し、伝達性海綿状脳症の発症を調べている。このアッセイ法は高感度で信頼性のある方法であるが、発病までにマウスで 200 日以上を必要とする。そのため、迅速な方法の開発が望まれている。そこで、今回得られた成果を基にして、今後、T98G 細胞を用いた異常プリオンタンパク質の *in vitro* アッセイ法を開発していきたい。

E. 結論

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G の全細胞溶解液に、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周期ではなく、その培養条件下の細胞密度に依存し、高細胞密度下で高い発現を示した。プリオンタンパク質の細胞内分布は、低細胞密度下では核周辺に局在し、接触阻止がかかった細胞では核周辺および細胞膜上に広く存在していた。また、ヒト・プリオンタンパク質のアミノ酸配列 106-126 残基に相当する合成ペプチドが、プリオンタンパク質の発現を一過性に誘導した。以上の結果から、正常プリオンタンパク質の発現および細胞内分布は、細胞間相互作用により制御され、細胞表面のプリオンタンパク質が関与していることが示唆された。

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)
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)