厚生科学研究費補助金　新興・再興感染症研究事業

# プリオン病の診断技術の開発に関する研究

平成12年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　品 川 森 一

平成13年(2001)4月

# 目　　次

**I. 総括研究報告**

プリオン病の診断技術の開発に関する研究 ---------------------- 1
品川森一

**II. 分担研究報告** ------------------------------------ 6

1．$PrP^{Sc}$検出のためのモノクローナル抗体作成とCaptured ELISA法の開発 ------ 7
品川森一

2．PrP合成ペプチドのスクレイピー新規診断法への応用の試み ------------ 9
堀内基広

3．可溶性ＰｒＰの発現系の確立とそのレコンビナント蛋白の解析 ---------- １１
北本哲之

4．白オリックスプリオン遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの作成 ------ １３
及びノックアウトマウスとの交配
小野寺節

5．実験動物を用いたプリオンのバイオアッセ -------------------- １５
（１）トランスジェニックマウスの評価
毛利資郎

6．プリオン病患者の脊髄液中14-3-3蛋白定量系について -------------- ２３
高橋秀宗

7．ヒトプリオン蛋白質に対する単クローン抗体の作製 ---------------- ２５
岡田義昭

8．プリオン病の早期診断に関する研究 ------------------------ ２７
西島正弘

9．食品中のプリオン蛋白質の高感度検出法の開発に関する研究 ----------- ２８
棚元憲一

**III. 研究成果の刊行に関する一覧表** ------------------------- ３２

**IV.研究成果の刊行物、別刷** ------------------------------ ３３

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染研究事業）
総括研究報告書

# プリオン病の診断技術の開発に関する研究

主任研究者　品川森一　帯広畜産大学　獣医公衆衛生学

研究要旨
プリオン病の診断にはバイオアッセイにより感染因子としてのプリオンを検出する方法と、免疫学的に正常なプリオン蛋白($PrP^{C}$)の異常型でプリオンを構成するプリオン蛋白（$PrP^{Sc}$）を検出して診断する方法がある。バイヲアッセイには時間がかかるため、種の壁を除いて潜伏期を短縮するためにトランスジェニック動物の作出が行われている。

本研究では１）各種ヒト型マウスのヒトプリオンに対する感受性の解析がから、マウス自身のPrPによりヒトプリオンに対する感受性が抑制され、ヒトプリオン蛋白(PrP)だけを発現するヒト型マウスが最も感受性が高いことが判った。２）シロオリックスPrP遺伝子を導入したマウスが作製され、その動物プリオン病に対する有用性の検定が始まったが、未だ成績が出ていない。

免疫学的に$PrP^{Sc}$を検出する方法の高感度化と共に簡便化を計ること、および、多様な検体に対応する試料調整法の開発を目的として、本年度は、１）陽性対照であり、検査感度の基準となる組換えPrP(rPrP)の作出、２）より反応性の高い抗体を選択するため、抗原を合成ペプチドからrPrPに替えてMAbを多数作製し、有用な抗体を1つ選択した。３）検出系として、抗原を固相化した従来のELISA法から、液相で反応させるサンドイッチELISAの開発を行った。この系の検出感度は決して高くはないが、迅速化が期待できた。さらに液相化抗原であれば、磁気ビーズによる特異的$PrP^{Sc}$の濃縮が可能であるため、液相化抗原試料調製法の検討を行うモニターとして有用である。一方ELISAを用いた系の高感度化として、基礎実験の段階であるが、４）標識合成ペプチドと抗体の複合体をプレートに結合した抗IgG抗体で補足する、競合ELISAの系が考案された。

PrP合成ペプチドが$PrP^{Sc}$特異的なプローブとなり、新診断法が確立できるか検討した。しかし、調べた4つの合成ペプチドは$PrP^{C}$と結合するが$PrP^{Sc}$とは結合せず、プローブとは成りえないことが判った。

また、プリオン病を疑われる患者の診断法として用いられる脊髄液中の14-3-3蛋白のガンマアイソタイプを検出することが診断精度を高めるということを明らかにした。

---

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・獣医公衆衛生学教授
堀内　基広・帯広畜産大学・原虫病研究センター兼獣医公衆衛生学助教授
北本　哲之・東北大学大院医学系・病態神経学教授
小野寺　節・東京大学農学部応用動物科学・応用免疫学教授
毛利　資郎・九州大学大学院医学系分子常態医学・実験動物学教授
高橋　秀宗・国立感染症研究所・感染病理部主任研究者
岡田　義昭・国立感染症研究所村山分室・細菌血液製剤部室長
西島　正則・国立感染症研究所・細胞化学部部長
棚元　憲一・国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部部長

## A.研究目的

ブリオン病の診断、血液製剤、医薬品、畜産食品、生体材料のブリオン汚染検出のため、免疫学的手段及びバイオアッセイによってプリオンを検出あるいは、関連蛋白の検出による診断法を改良し、高感度化・迅速化と実用化を図る。このことにより、プリオン病のヒトへ或はヒト間の伝播、遷延を未然に防ぐことを目的とする。

## B．研究方法

１）これまでに開発された、遺伝子型の異なったヒト及びシロオリックスのプPrP遺伝子導入マウ

スのヒト、マウスプリオンに対する感受性を調べ、有用性を検討した。

2）免疫学的手段による異常PrP($PrP^{Sc}$) 検出用の反応性の高い抗体を選択するため、持続的に組換えプリオン蛋白による多数のモノクローナル抗体（MAb)を作成した。動物種の異なる組換えPrPを用いて、種特異性を検討し、ウエスタンブロットと未変性PrPを用いたELISAの比較から、エピトープの構造を推定する。抗体の有用性は、実際の検出系に用いて比較した。

3）$PrP^{Sc}$検出の陽性対照として、また検出系の検定を行うための各種組換えプリオン蛋白を大腸菌で発現させアフィニティ-カラム、HPLC等で精製をおこなった。

4）新たな$PrP^{Sc}$の検出系として、液相の抗原として先ず組換えPrPと合成ペプチドを用いてcaptured ELISA及び競合ELISA等の開発を検討した。

5）$PrP^{Sc}$を液相として抗体と反応させうる試料調整法として、グアニジン塩を変性溶解剤とした時は希釈による阻害の除去を検討した。。

C. 研究結果

1)ヒト型トランスジェニック(Tg）マウスの評価：バイオアッセイによる早期診断法のために、ヒト/マウスキメラ型PrP遺伝子導入マウス（Tg#30, Tg#12, Tg#21）、同じ導入ベクターを用いた全マウス型PrP遺伝子導入マウス（TgMo#22, TgMo#39）のそれぞれヒトプリオン及びマウスプリオンに対する感受性評価を行った。散発性CJD(129Met/ Met)患者脳乳剤（H３）とCJD-Fukuoka 1株（F１株）マウス脳乳剤を用いた。ヒト/マウスキメラPrP遺伝子導入マウスはヒトプリオンに対して潜伏期が最短132日と高感受性を示すと評価できた。また、マウス内在性のPrP遺伝子の存在がヒト・プリオンの感受性に抑制的に働くことが明らかとなった。一方、同じ導入ベクターを用いながら全マウス型PrP遺伝子発現マウスでは内因性のマウスPrP遺伝子に相加的に作用することがことが示された。さらに、これらのヒト/マウスキメラPrP遺伝子導入マウスでは発現量の増加が必ずしも感受性の増加にはならないことも明らかにされた。

2）動物PrPのTgマウス：マウスPrP遺伝子を持たないオリックス型Tgマウスが戻し交配で完成した。脳、骨格筋及び心筋にPrP遺伝子の発現が観察された。また、マウスPrP遺伝子をヘテロに持つTgマウスを用いた感染実験では、マウスプリオンに対して野生型より潜伏期の短縮が観察された。

3）rPrPの作製：ヒトrPrPを検出系の標準蛋白として必要な可溶性の形で得られる発現系で成功した。正常多形の殆どが2量体を形成しているが、コドン219LysのrPrPは単量体であり、この型が異常化に抵抗性を示すこととの関連が示唆された。動物rPrPとしてHis-Tag融合蛋白として、マウス、ハムスター、ヒツジ及びウシが用意できた。精製はニッケルキレートカラムを用い、低pH透析後、HPLCで精製して可溶性rPrPを多量に得る系が確立出来た。

4）rPrPに対するMAbの作製：マウスrPrPを抗原としてPrPノックアウトマウスを用いて、15MAbが得られた。エピトープの違い、エピトープの構造及び種特異性から6群に分けられた。多くは種を超えて反応したが、一部マウス特異な物も有った。リニアーエピトープを認識する抗体3つを選び、後の実験に用いた。羊rPrPに対するMAbを3つ得たが解析に至っていない。

5）検出系の検討：$PrP^{Sc}$を可溶化して液相の抗原として抗原抗体反応を実施できれば、迅速化、簡便化及び高感度化が計れる。しかし、まだ十分に満足できる試料調整法は開発されていない。試料調整法をモニターするためのcaptured ELISAの開発を行った。capture 抗体として3MAbの混合物及びウサギ抗体B103がPrP捕捉能が高く、次いでMAbの一つ31C6であった。この系ではPrPScの可溶化剤としてチオシアン酸グアニジンを0.4Mまで希釈すれば可溶性抗原として使用できることが判った。検出感度は20μg脳等量と高くはなかったが、モニターの系としては有用である。

6）競合ELISA：$PrP^{Sc}$検出の高感度化のため、競合ELISAの系を検討した。液相で一定量の酵素標識PrP合成ペプチドと対応する抗体と複合体を形成させるプレートに固相化した抗IgG抗体によって複合体を捕捉し、標識された合成ペプチドの量を測定する。複合体生成時に被験試料を加えてそこに含まれるPrPにより複合体形成を競合阻害させる原理であり、合成ペプチドを競合物質とした場合は10～15nMで阻害が見られた。

7）試験管内PrP変換において$PrP^{C}$が$PrP^{Sc}$と特異的に結合し変換が起きるが、特定のPrP合成ペプチドは変換を阻害する。この阻害がペプチドとPrPScの結合よるとすれば、$PrP^{Sc}$特異的なプローブとなり、新たな診断法が確立できる。調べた4つの合成ペプチドは$PrP^{C}$と結合するが$PrP^{Sc}$とは結合しなかった。

8）14-3-3蛋白のガンマアイソタイプ特異抗体を組換え蛋白を用いて作製した。ウエスタンブロットによる定量から、脊髄液中のガンマアイソタイプ量はプリオン病では50ng/ml以上で、非プリオン病では10ng/ml以下であった。14-3-3蛋白のガンマアイソタイプを定量することにより、プリオン病の診断精度を上げることが出来た。

D．考察

東北大学で作製されたヒト型Tgマウスの内、マウスPrPを持たない系は非常に潜伏期が短く、ヒトプリオンに有用であることが判った。しかし、それでもなお3ヶ月以上の潜伏期を要する。マウスの場合、発症以前から細網リンパ系組織に$PrP^{Sc}$の蓄積が見られるため、免疫学的に蓄積された$PrP^{Sc}$を検出すれば、極めて短期間でバイオアッセイを行うことが出来る可能性が出てきた。

オリックスPrP遺伝子のTgマウスはマウスプリオンに対して野生型より潜伏期が短かったが、羊プリオンの成績がないので、有用性は未知で有る。

作製された可溶性のヒト、マウス、ハムスター、ヒツジ、ウシrPrPは免疫生化学的な$PrP^{Sc}$検出系の標準物質として必要であり、さらに、反応性の高い抗体を得るための免疫原としても使用できる。一方、rPrPあるいは合成ペプチドを用いて開発された系はこれらあるいは精製$PrP^{Sc}$を抗原として用いる場合は有効でも、夾雑物と可溶化剤等を含む試料で期待通りに働く保障がないことに留意する必要が有る。

プリオン病の組織には、早期ではプリオン濃度が低い。また畜産物等がプリオンに汚染されていてもその濃度は低いと予想される。このような被験材料から$PrP^{Sc}$を検出ためには、極めて鋭敏な検出法を用いるか、あるいは比較的大量の検体から、選択的にPrPScを濃縮する必要が有る。今回確立されたcaptured ELISAの系は$PrP^{Sc}$検出の迅速性は確保されるが、感度が低いため、磁気ビーズ法などで特異的に$PrP^{Sc}$を濃縮するための、液相抗原試料調製法の検討の道具と考えるべきであろう。一方、競合ELISAの系は高感度であるが、実用化には、実際の試料を加えた場合も問題がないと言う保障と、適した試料調整法の開発が残されている。

抗PrP抗体が多く作製されているし、本研究班でも作成している。しかし、実際に免疫学的検出に適した抗体は数少なく、更に多数の抗体、特にMAbを作成し、適したものの選択が必要である。

合成ペプチドによる試験管内PrP変換の阻害から$PrP^{Sc}$特異的なプローブとなる可能性が有った。しかし、調べた4つの合成ペプチドは$PrP^{C}$と結合するが$PrP^{Sc}$とは結合しなかった。合成阻害はPrPCと結合することによって起きていたことが判った。

14-3-3蛋白はプリオン病に特異なものではないが、ガンマアイソタイプの値が非プリオン病とプリオン病で異なり、プリオン病で高くなることを突き止めた。ガンマアイソタイプ特異抗体が作製できたため、生前のプリオン病診断精度を高めることが出来たことは、臨床的に有意義である。

E．結論

1）ヒトプリオンに高感受性のヒト型PrP（ヒト/マウスキメラPrP遺伝子導入）マウスが完成したが、動物PrP導入Tgマウスは動物プリオンに対する感受性は未だ判らない。

2）ヒト、マウス、ハムスター、ウシ及びヒツジのrPrPが可溶性の形で精製されるようになった。ヒトrPrPの正常多形の殆どが2量体を形成しているが、コドン219LysのrPrPは単量体であった。

3）rPrPに対する15MAbが作製され、1つがcapture抗体として有用と判定された。

4）capture ELISAが確立されたが、検出感度は高くなかった。

5）競合ELISAが確立され、合成ペプチドを競合阻害物とした場合は高感度であった。

6）合成ペプチドをプローブとする試みは成功しなかった。

7）4-3-3蛋白のガンマアイソタイプ特異抗体を作製し、ガンマアイソタイプの値が非プリオン病とプリオン病で異なり、プリオン病で高くなることを突き止めた。

F．健康危険情報

特別になし

G．研究発表

Nakamura. S. Ono. F., Hamano. M., Odagiri. K.. Kubo. M., Komatsuzaka. K., Terano. K., Shinagawa. M., Takahashi. K. and Yoshikawa. Y. Immunohistochemical detection of apolipoprotein E within prion-associated lesions in squirrel monkey brains. Acta Neuropathol. 100: 365-370. 2000

Horiuchi. M., Priola. S.A., Chabry. J. and Caughey. B. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species

barrier. Pric. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 5836-5841, 2000

Wong, C., Xiong, L.-W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., and Caughey, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein is stimulated by sulfated glycans. *EMBO J.* **20**: 377-386, 2001

Konaka K, Kaido M, Okuda Y, Aoike F, Abe K, Kitamoto T, Yanagihara T. Proton magnetic resonance spectroscopy of a patient with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. Neuroradiology 42: 662-5, 2000

Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T, Sato T. Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. Epidemiol. Infect. 125: 201-5, 2000

Kitamoto T. Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology. 20 Suppl: S52-4, 2000

Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T. Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. Neurosci Lett. 288: 179-82, 2000

Onodera, T.: Role of prion protein (Review). Modern Aspect of Immunobiology 1: 25-35, 2000

Kuwahara, C., Kubosaki, A., Nishimura, T., Nasu, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Enhanced expression of cellular prion protein gene by insulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268: 763-766, 2000.

Hashimoto, A., Onodera, T., Ikeda, H., and Kitani, H: Isolation and characterization of fetal bovine brain cells in primary cultures. Res. Vet. Sci. 69:39-46, 2000.

Onodera, T., and Saeki, K.: Japanese scrapie cases (Review). Jpn. J. Inf. Dis. 53: 56-61, 2000.

Kubosaki, A., Ueno, A., Matsumoto, Y., Doi, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Analysis of prion protein mRNA by in situ hybridization in brain and placenta of sheep. Biochem. Biophys. Res. Commun. 273: 890-893, 2000.

Kenny K, Brechtel C, Takahashi H, Kurohara K, Anderson P, Gibbs CJ Jr. An enzyme-linked immunosorbent assay to quantify 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of suspected Creutzfeldt-Jakob disease patients. Ann Neurol. 48: 395-398, 2000

Naito, S., Y. Okada, M. Takahashi, H. Kato, M.Tanechi, Y. Ami, Y. Suzaki, T. Oka, K.Okuma, K. Morokuma, H. Onodera, M. Inoue, Y. Takahashi, S. Yamazaki, H. Kimura, K. Komuro, and T. Uchida. 2000. Anti-tetanus toxoid antibody production and protection against lethal doses of tetanus toxin in hu-pbl-scid mice. Int Arch Allergy Immunol 123: 149-154.

毛利資郎：プリオン病の感染予防　脳の科学 22: 751-756, 2000.

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、種市麻衣子、斎賀菊江、小室勝利. フィブリン接着剤の役割と安全性 Surgery frontier 7: 95-100, 2000

絹見朋也、山河芳夫、西島正弘 “プリオン蛋白異常化のメカニズム” 脳 の科学　22: 731-736, 2000

2．学会発表

堀内基広、石黒直隆、品川森一：異種PrPCによるPrPSc産生の阻害　第129回日本獣医学会　つくば 2000年

堀内基広：プリオン蛋白質とプリオン病　蛋白合同年会東京2000　東京 2000年

堀内基広、品川森一：PrP合成ペプチドによるPrPC-PrPSc相互作用の阻害　第48回日本ウイルス学会 津 2000年

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、小室勝利：In vitro におけるパルボウイルスB19感染の検出法　第48回日本ウイルス学会 津 2000年

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回日本生化学会大会、1998年

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質のヒト・グリオーマ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

Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Takatori, K. and Sawada, J. High-level expression of cellular form of prion protein in human glioblastoma cell line T98G. Infection of Nervous System: Host-Pathogen Interactions, March 9-14, 1999 Keystone Symposia on Molecular &

Cellular Biology

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

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

G.知的所有権の取得状況

糸原重美、局博一、小野寺節：心臓に異常を示すプリオン遺伝子改変マウスとその使用（申請中）

糸原重美、局博一、小野寺節：心臓に異常を示すプリオン遺伝子改変マウスとその使用（申請中）

# II. 分担研究報告

# 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染研究事業）
# 分担研究報告書

## プリオン病の診断技術の開発に関する研究
### $PrP^{Sc}$検出のためのモノクローナル抗体作成とCaptured ELISA法の開発

分担者　品川森一　帯広畜産大学　獣医公衆衛生学教授

研究要旨

$PrP^{Sc}$検出の高感度化と反応系の簡便化を計ることを目的として、反応性の高いモノクローナル抗体（MAb)の作成と反応系の改良のため、captured ELISA系を確立した。MAb作成と抗体評価のため、種及びPrPの領域部分に分けた各種recombinant PrP(rPrP)を作成した。PrPノックアウトマウスを用いて抗マウスPrP MAbを15，正常マウスを用いて抗羊PrP MAbを３つ得た。抗羊PrP MAbの解析は進んでいないが、抗マウスPrP MAbはエピトープの違いと種特異性から6群に分けられ、3つを選んでELISA構築に用いた。

---

A. 研究目的

$PrP^{Sc}$検出法の改良を目的として、反応性の高いモノクローナル抗体（MAb)の作成と、抗原を液相で反応させる試料調整法のモニタ-として使用するためのCaptured ELISAの構築を行った。

B.研究方法

マウス、ハムスター、羊及び牛のrPrPコドン23～231及び、マウスPrPの各種領域をHis-Tagとの融合蛋白として得、ニッケルキレートカラム、HPLCを用いて精製した。

マウスrPrPはPrPノックアウトマウスに羊rPrPはC57BLで免疫し、ハイブリドーマのスクリーニングは免疫に用いたrPrPと、マウス脳からのＰｒＰｓｃを用いた。エピトープマッピングには違った領域だけのrPrPを用いた。

3つのMAbあるいはその混合物、ポリクローナル抗体B103をcapture抗体として用いた。MAbを用いた場合は検出系にB103とペルオキシダーゼ(HRP）標識抗ウサギIgGを、B103の場合はビオチン化B103とHRPーストレプトアビジンを用いた。条件設定にはrPrPを、系の有効性の確認にはマウス粗プリオン画分を用いた。

プリオン調製用のマウスは帯広畜産大学動物実験委員会実験指針に従って、麻酔下で接種を行い、発症した動物は末期にエーテル酔下で安楽死させた。

C．結果

マウスrPrPに対するMAbの内、15が性状解析が凡完了し、6群に分けられた。リニア-エピトープを認識する３つを、以後のcapture抗体として使用した。抗羊rPrP MAbの解析は未だ済んでいない。

Capture抗体を500ngづつプレートに一夜吸着させた。液相の抗原は、実際には$PrP^{Sc}$の試料の可溶化にグアニジン塩が使用されることを想定し、マウスrPrPを各種濃度のチオシアン酸グアニジンに100ngに溶解して加え、グアニジンの阻害濃度の検討を行った。0.4M以下であれば大きな影響が無いことがわかったため、これまで、ウエスタンブロット及び抗原固相化ELISAに用いる粗プリオン画分を用いてcaptured ELISAが有効に使用できるか調べた。粗プリオン画分を3Mのチオシアン酸グアニジンに溶解し、希釈してグアニジン濃度の影響を確認したところ、0.4Mグアニジンより低い方がいくぶん良好なに反応したが、希釈により、試料濃度低下するため、全体的に$PrP^{Sc}$の検出感度は0.4Ｍが適当であった。抗体のcapture能はB103及びMAbの混合物が最も効率良く、次いでMAb 31C6であったが、他の2MAbは低かった。PrPScの最小検出必要量は凡20μg脳等量であった。

D．考察

Captured ELISAの系が脳由来プリオン試料でも使用可能なことが判った。抗原固相化法に比べて吸着の時間が不用となるため迅速化は期待できる。しかし、PrPScの検出感度はは決して他の方法に比べて

高くはなかった。PrP$^{Sc}$を液相として検出する最大の問題点は試料調製法が確立されていないことに有るため、今回開発したcaptured ELISAの系は、PrP$^{Sc}$の特異的濃縮に使用可能と考えられる磁気ビーズ法等に用いる試料の調製法を検討するためのモニタ-としても有用である。

E.結論

PrP$^{Sc}$検出に有効な抗体を用意するために、MAbの作成を行い、比較的有効な抗体を1つを得た。Captured ELISAの系を確立出来た。感度は高くなかったが、迅速性が期待できるし、液相抗原調製法のモニタ-として使用できる。

F．健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

Nakamura, S. Ono, F., Hamano, M., Odagiri, K., Kubo, M., Komatsuzaka, K., Terano, K., Shinagawa, M., Takahashi, K. and Yoshikawa, Y. Immunohistochemical detection of apolipoprotein E within prion-associated lesions in squirrel monkey brains. Acta Neuropathol. 100: 365-370. 2000

G.特許申請

なし

# 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染研究事業）
# 分担研究報告書

## プリオン病の診断技術の開発に関する研究
### PrP合成ペプチドのスクレイピー新規診断法への応用の試み

堀内　基広　帯広畜産大学・原虫病研究センター・獣医公衆衛生学助教授

研究要旨

従来法とは原理が異なる簡便かつ迅速なプリオン病診断法の開発には、$PrP^{C}$とは反応せず、$PrP^{Sc}$と選択的に反応する分子プローブが必要不可欠である。このような分子プローブは診断法の高感度化にも寄与すると考えられるが、現在まで、実用的な$PrP^{Sc}$特異的分子プローブはない。そこで、$PrP^{C}$が$PrP^{Sc}$と選択的に結合するという性質に着目して、$PrP^{C}$分子そのもの、あるいはその一部であるPrP合成ペプチドが$PrP^{Sc}$特異的なリガンドとして$PrP^{Sc}$の検出に応用できるか否かについて検討した。複数のPrP合成ペプチドが$PrP^{Sc}$-$PrP^{C}$の会合を抑制した。しかし期待に反し、それらのPrP合成ペプチドは$PrP^{C}$と結合したが、$PrP^{Sc}$とは結合しなかった。従って、$PrP^{C}$分子は$PrP^{Sc}$特異的なプローブと成りうる可能性はあるが、PrP合成ペプチドは$PrP^{Sc}$特異的なプローブとしては機能しないことが明らかとなった。

---

### A. 研究目的

現行の免疫生化学的手法によるプリオン病診断法は、1)界面活性剤処理および蛋白分解酵素処理による$PrP^{C}$の除去、2)$PrP^{Sc}$の変性剤処理、3)抗PrP抗体によるPrP分子の検出の、３つの要素から成る。現在使用されている抗PrP抗体は、$PrP^{C}$と$PrP^{Sc}$を識別できないため、1)および2)の処理が必要不可欠である。しかしこのことが、$PrP^{Sc}$検出によるプリオン病診断法の簡便化および迅速化の障壁となっている。$PrP^{Sc}$と選択的に反応する分子プローブが利用可能ならば、1)および2)の操作が簡略化できるので、従来法とは異なる新規原理に基づくプリオン病簡便・迅速診断法開発への道が開けるが、今のところ実用可能な$PrP^{Sc}$特異的抗体はない。そこで我々は、$PrP^{C}$が$PrP^{Sc}$と選択的に結合するという性質に着目して、$PrP^{C}$分子そのもの、あるいはその一部であるPrP合成ペプチドが$PrP^{Sc}$特異的なリガンドとして$PrP^{Sc}$の検出に応用できるか否かについて検討した。

### B. 研究方法

ハムスター(ha)PrP109-141、haPrP117-141、haPrP121-141、haPrP166-179、haPrP180-199、haPrP200-223、haPrP218-231の各種合成ペプチドを使用した。$^{35}$S標識$PrP^{C}$は$^{35}$Sメチオニンでmetabolic labelした細胞から免疫沈降法により精製した。$PrP^{Sc}$は263Kハムスター馴化スクレイピー株を接種されたハムスターの脳から精製した。合成ペプチドと$PrP^{Sc}$および$PrP^{C}$との反応性は、$^{35}$S標識$PrP^{C}$を$PrP^{Sc}$存在下で$PrP^{Sc}$様の蛋白質分解酵素抵抗性分子PrP-resに転換させる試験官内転換反応およびマイクロプレート上での結合試験により解析した。

### C. 研究結果

合成ペプチドhaPrP109-141、haPrP117-141、haPrP166-179、haPrP180-199、haPrP200-223はそれぞれ、50%阻害濃度($IC_{50}$)が、〜10、〜40、〜10、〜500、〜10$\mu$MでPrP-resの産生を阻害した。これらのうちhaPrP109-141およびhaPrP117-141については既に報告されている(Chabry et al, 1998)。しかし、haPrP121-141およびhaPrP218-231は同反応を阻害しなかった。結合試験からPrP合成ペプチドによるPrP-resの産生阻害は、合成ペプチドが$PrP^{C}$と$PrP^{Sc}$の結合を阻害するためであることが明らかとなった。今回新たに強いPrP-res生成阻害活性が見出された２種のPrP合成ペプチドのうち、ha166-179の効果はアミノ酸配列特異的であったが、ha200-223の効果はアミノ酸配列特異的ではなかった。幾つかのPrP合成ペプチドが$PrP^{C}$もしくは$PrP^{Sc}$に作用することが明らかとなったので、PrP合成ペプチドが$PrP^{C}$および$PrP^{Sc}$のどちらに結合するかを調べたところ、PrP合成ペプチドは$PrP^{C}$と結合したが、$PrP^{Sc}$と結合する

ことを示唆する結果は得られなかった。

D. 考察

PrP$^{C}$分子はPrP$^{Sc}$と選択的に結合する。しかし、その一部であるPrP合成ペプチドは、今回使用した条件下では、PrP$^{C}$の一部としてではなく、PrP$^{Sc}$分子様の挙動をするためにPrP$^{C}$と結合したと考えられる。従って単一のPrP合成ペプチドは、PrP$^{Sc}$分子を特異的に検出する分子プローブとしては機能しない。PrP$^{C}$分子内の高次構造がPrP$^{Sc}$との結合に必要であることが示唆されている。従って、PrP合成ペプチドをPrP$^{Sc}$特異的分子プローブとして使用するためには、PrP$^{C}$分子上のPrP$^{Sc}$への結合ドメインの高次構造を明らかにして、複数のPrPペプチドでその構造を模倣する等の対策が必要と考えられる。

E. 結論

PrP$^{C}$分子はPrP$^{Sc}$と選択的に結合するが、その一部であるPrP合成ペプチドはPrP$^{Sc}$とは結合しないことから、PrP合成ペプチドはPrP$^{Sc}$特異的なリガンドとしては使用できないことが判明した。今後、PrP$^{Sc}$特異的なモノクローナル抗体やPrP以外のペプチド性リガンド、あるいは核酸性リガンドの開発が必要である。

F. 健康危険情報

本研究にはハムスタースクレイピーをモデルとして用いている。実際に感染性を有するPrP$^{Sc}$画分を使用しているが、感染性を有するPrP$^{Sc}$の操作は全てClass 2bに対応した安全キャビネット内で行なっている。また、汚染物はプリオンの不活化に有効である焼却処理、あるいは、132度、60～90分のオートクレーブ処理している。このように、バイオハザード対策についても適切な処置を施している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Horiuchi, M., Priola, S. A., Chabry, J. and Caughey, B. Interactions between heterologous forms of prion protein : binding, inhibition of conversion, and species barrier. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* **97**: 5836-5841, 2000

Wong, C., Xiong, L.-W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., and Caughey, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein is stimulated by sulfated glycans. *EMBO J.* **20**: 377-386, 2001

2. 学会発表

堀内基広、石黒直隆、品川森一：異種PrP$^{C}$によるPrP$^{Sc}$産生の阻害、第129回日本獣医学会 つくば(2000)

堀内基広：プリオン蛋白質とプリオン病蛋白合同年会東京2000 東京(2000)

堀内基広、品川 森一：PrP合成ペプチドによるPrP$^{C}$-PrP$^{Sc}$間相互作用の阻害、第48回日本ウイルス学会 津(2000)

# 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染研究事業）
# 分担研究報告書

## プリオン病の診断技術の開発に関する研究
### 可溶性ＰｒＰの発現系の確立とそのレコンビナント蛋白の解析

分担研究者　北本哲之　東北大学医学部病態神経学教授

研究要旨
プリオン蛋白のimmunoassay法の確立にとって、なくてはならない可溶性PrPの標準蛋白の精製に大腸菌を利用したレコンビナントPrP発現系で成功した。可溶性のレコンビナントPrPは、正常多型のcodon219Gluでは、codon129がValであろうとMetであろうとdimerを形成し、codon219Lysではmonomerであることが大部分であることが明らかとなった。従来のProtein X仮説以外に、codon219Lysがプリオン蛋白の異常化に抵抗性を示す理由として、正常型のPrPの存在様式がdimerなのかmonomerなのかが重要となる可能性が出てきた。

---

A. 研究目的
プリオン病の高感度のアッセイ法を確立する上で、重要なことの一つとして標準とするプリオン蛋白を如何に選択するかということが考えられる。特に、イムノアッセイ法では、標準蛋白こそがその感度の評価となり得る。そこで、今年度は出来る限りPrPCのコンフォーメイションを保ちながらの標準蛋白の精製を行い、その精製過程で興味ある結果を得たので報告する。

B.研究方法
大腸菌を用いたレコンビナントPrP発現のうち、Periplasmic expressionを中心としたPlasmidを利用した。具体的には、マウスのPrPC121-２３０の構造をMRI解析したチューリッヒ大学のpPrP、pET、pMalcである。periplasmic expressionを利用した理由は、S-S結合の還元化を抑え、helix B-Cの構造を自然なものとするのが第一の理由である。

C.研究結果
１）ヒトPrP122-230の可溶性PrPの発現系が確立できた。この発現系は、codon129Met/codon219Glu, codon129Val /codon219Glu , codon129Met/codon219Lysと3種類の正常多型の発現系を確立した。
２）ゲルろ過解析によって、溶出される位置の分子量から codon129Val/codon219Glu , codon129Met/codon219Gluの２つのPrPはdimerを形成し、codon129 Met/codon219Lysはmonomerとして存在していることが、レコンビナント蛋白で証明できた。

D．考察
従来のProtein X仮説以外に、codon219Lysがプリオン蛋白の異常化に抵抗性を示す理由として、正常型のPrPの存在様式がdimerなのかmonomerなのかが重要となる可能性が出てきた。

E.結論
プリオン蛋白のimmunoassay法の確立にとって、なくてはならない可溶性PrPの標準蛋白の精製に大腸菌を利用したレコンビナントPrP発現系で成功した。
可溶性のレコンビナントPrPは、正常多型のcodon219Gluでは、codon129がValであろうとMetであろうとdimerを形成し、codon219Lysではmonomerであることが大部分であることが明らかとなった。従来のProtein X仮説以外に、codon219Lysがプリオン蛋白の異常化に抵抗性を示す理由として、正常型のPrPの存在様式がdimerなのかmonomerなのかが重要となる可能性が出てきた。

F．健康危険情報
特になし

G.研究発表

1. 論文発表

Konaka K, Kaido M, Okuda Y, Aoike F, Abe K, Kitamoto T, Yanagihara T. Proton magnetic resonance spectroscopy of a patient with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. Neuroradiology. 2000 Sep;42(9):662-5.

Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T, Sato T. Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. Epidemiol Infect. 2000 Aug;125(1):201-5.

Kitamoto T. Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology. 2000 Sep;20 Suppl:S52-4.

Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T. Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. Neurosci Lett. 2000 Jul 21;288(3):179-82.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染研究事業）
分担研究報告書

# プリオン病の診断技術の開発に関する研究

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

分担研究者　小野寺節　東京大学農学部教授

研究要旨
マウスプリオン遺伝子を持たないオリックス型トランスジェニックマウスを作成した。脳、骨格筋及び心筋に遺伝子の発現が観察された。また、マウスプリオン遺伝子も持つヘテロトランスジェニックマウスを用いた感染実験で は、潜伏期の短縮が観察された。

A.研究目的

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

B.研究方法

前年得られたマウスについてノックアウトマウスと交配し、オリックス型プリオン遺伝子(o-Prnp)マウスを作製した。また、前年得られたマウスについて、臓器毎にオリックス型遺伝子のRT-PCR及びノーザンブロッティングをおこなった。さらに異常の見られたマウスについて、病理組織学的検索および、心電図の波形検査を行った。

繁殖及び感染実験は本学動物実験委員会の動物実験指針に従って実施した。麻酔下で接種を行い、発症した動物に関しては終末期に至る前にエーテル酔下で安楽死させた。

C.研究結果

o-Prnpホモのマウスについて、RT-PCRを行い、脳、筋肉、心臓、にオリックス遺伝子のmRNAを検出した、さらに、Prnd遺伝子の発現もこれらの臓器で確認した。病理組織学的には３０週齢より心筋一部に変性が観察された。マウスのプリオン遺伝子を持つo-Prnpヘテロのマウスについて、スクレイピー筑波１株を用いた感染実験を行った。その結果、感染後１００日頃より発症が観察された。o-Prnpを持たないlitter mateにおいては、１３０日頃より発症が確認された。現在病理組織学を観察中である。

D.考察

一般に海綿状脳症の伝達性および発症までの期間は各種のプリオン蛋白の数個のアミノ酸の違いによるという可能性が示唆されているo-Prnpはヒツジのプリオン 遺伝子と１アミノ酸異なるのみで、この１アミノ酸の違いが病原体に対する感受性、及び組織病変に関与している可能性が考えられる。少なくとも我々のヘテロマウスにおいて、潜伏期の短縮が見られたことから、o-Prnpはm-Prnp（マウス型）と同様の作用をスクレイピー病原体に対して持つ事が考えられる。現在、 o-Prnpホモマウスを用いてプリオン病原体の実験株の作製を計画中である。

E.結論

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

F．健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

Onodera, T.: Role of prion protein (Review).

Modern Aspect of Immunobiology 1:25-35, 2000
Kuwahara, C., Kubosaki, A., Nishimura, T., Nasu, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Enhanced expression of cellular prion protein gene by insulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:763-766, 2000.
Hashimoto, A., Onodera, T., Ikeda, H., and Kitani, H: Isolation and characterization of fetal bovine brain cells in primary cultures. Res. Vet. Sci. 69:39-46, 2000.
Onodera, T., and Saeki, K.: Japanese scrapie cases (Review). Jpn. J. Inf. Dis. 53(6):56-61, 2000.
Kubosaki, A., Ueno, A., Matsumoto, Y., Doi, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Analysis of prion protein mRNA by in situ hybridization in brain and placenta of sheep. Biochem. Biophys. Res. Commun. 273:890-893, 2000.
Kubosaki, A., Yusa, S., Nasu, Y., Nishimura,T., Saeki, K.,
Matsumoto, Y., Itohara, S., and Onodera, T.: Regulation of cellular form of prion protein in mouse T lymphocyte development,
analyzed by wild-type prion gene-deficient mice. Internatl. Immunol. (submitted), 2000.

G.特許申請

糸原重美、局博一、小野寺節：心臓に異常を示すプリオン遺伝子改変マウスとその使用（申請中）

# 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）
# 分担研究報告書

## プリオン病の診断技術の開発に関する研究
### 実験動物を用いたプリオンのバイオアッセイ
### （1）トランスジェニックマウスの評価

分担研究者　毛利資郎　九州大学大学院・医学研究院・実験動物学教授

研究協力者
北本　哲之（東北大・大学院医・病態神経）
三好　一郎（東北大・大学院医・動物実験施設）

研究要旨
マウスを用いたバイオアッセイによる早期診断法を確立するために、東北大学で作製されたトランスジェニックマウスの感受性を評価した。評価したTgマウスはヒト/マウスキメラ型プリオンタンパク遺伝子導入マウス（Tg#30, Tg#12, Tg#21）、同じ導入ベクターを用いた全マウス型プリオンタンパク遺伝子導入マウス（TgMo#22, TgMo#39）である。接種材料は散発性CJD(129Met/Met)患者脳乳剤（H3）とCJD-Fukuoka 1株（F 1株）マウス脳乳剤を用いた。その結果、このヒト/マウスキメラプリオンタンパク遺伝子導入マウスはヒトプリオンに対して高感受性を示すと評価できた。そして、マウス内在性のプリオンタンパク遺伝子の存在がヒト・プリオンの感受性に抑制的に働くことが明らかとなった。一方、同じ導入ベクターを用いながら全マウス型プリオンタンパク遺伝子発現マウスでは内因性のマウスプリオンタンパク遺伝子に相加的に作用することがことが示された。また、これらのヒト/マウスキメラプリオンタンパク遺伝子導入マウスでは発現量の増加が必ずしも感受性の増加にはならないことも明らかにされた。

A. 研究目的
　プリオンの感染性を評価するにはバイオアッセイ法が最も感度が高く確実であるが、種の壁（Species barrier）が存在するためにヒトに対する感受性を調べることは困難である。現在、世界中でヒトのプリオンタンパク遺伝子を導入し、ヒト型のプリオンを産生するマウスを用いた研究が試みられている。われわれはヒト/マウスキメラ型プリオンタンパク遺伝子産物の過剰発現系を用いて、ヒトプリオンに対して高感受性トランスジェニック（Tg）マウスモデルマウスを開発し、実験動物を用いたバイオアッセイ法によるプリオンの早期診断系を確立するのが目的である。

B. 材料と方法
　1. マウス：
　1) ヒト／マウスキメラ型プリオン蛋白遺伝子発現マウス
　　北本、三好らの作製によるマウスPrP遺伝子exson 3 のORFの制限酵素サイトSma IからBstEII間をヒト型のプリオンタンパク遺伝子に換えたヒト／マウスキメラプリオン蛋白遺伝子発現Tgマウスを用いた。挿入ヒトPrP遺伝子のcodon129がメチオニンタイプ1系統（Tg#30）、バリンタイプ２系統（Tg#12、Tg#21）をそれぞれプリオン蛋白遺伝子欠損マウス、Prnp 0/0マウス（糸原博士より分与、）と交配し、マウス内在性プリオンの除去された完全なヒト／マウスキメラ型プリオン遺伝子発現マウス３系統を樹立した。この課程で作られる内在性マウスプリオン蛋白遺伝子Prnp w/0のヘテロマウス、Tgをもたないワイルドマウスを対照として、以下のような遺伝子型をもつ３系統、12ラインをヒトプリオンの感受性試験に用いた。
　Tg#30 HuPrP(129Met) +/- ・0/0
　Tg#30 HuPrP(129Met) +/- ・w/0
　Tg#30 HuPrP(129Met) +/- ・w/w
　Tg#30 HuPrP(129Met) -/- ・w/w
　Tg#12 HuPrP(129Val) +/- ・0/0

Tg#12 HuPrP(129Val) + /- ・0/w
Tg#12 HuPrP(129Val) + /- ・w/w
Tg#12 HuPrP(129Val) -/- ・w/w
Tg#21 HuPrP(129Val) + /- ・0/0
Tg#21 HuPrP(129Val) + /- ・0/w
Tg#21 HuPrP(129Val) + /- ・w/w
Tg#21 HuPrP(129Val) -/- ・w/w

2）マウスワイルド型プリオンタンパク遺伝子発現マウス

上述のヒト/マウスキメラプリオンタンパク遺伝子導入マウスと全く同じ構造の遺伝子ベクターを用い、全てをマウス型としたマウスワイルド型プリオンタンパク遺伝子発現マウスについて、CJDのマウス順化F1株を用いて感受性試験を行った。

2. PCRとサザンブロットによる遺伝子スクリーニング

PCR法に加えて、導入遺伝子については制限酵素Sac Iとchw プローブをもちいて、内在性のマウスPrP遺伝子については制限酵素Bam HIと3'プローブで確認試験を行った。

3. ウェスタンブロット

系統として確立されたヒト／マウスキメラ遺伝子導入マウスがヒト型のプリオン蛋白を発現しているかどうか、感受性試験に際して実際にヒト型プリオン蛋白が異常型プリオン蛋白に変換されているかどうかを調べるためにCollinge らの方法に準じてWestern blotを行った。一次抗体として、マウスプリオン蛋白検出にはウサギポリクローナル抗体1B3（BBSRC & MRC, NPU, Edinburgh の Mrs Farquharより分与）、ヒトプリオン蛋白用にはモノクローナル抗体3F4を用いた。発色系はalkaline phosphatase-PCIB/NBT (Promega)を用いた。

4. 接種材料

129Met/Met型のPrP遺伝子をもつsporadic CJD患者10％脳乳剤（H3）20 $\mu$lを脳内接種（i.c.)、一部には129Val/ Met 型遺伝子のsporadic CJD 患者10％脳乳剤（P）を同様に接種した。

5. 潜伏期間

接種日を0日とし、反応遅延、運動失調、削痩、無動などの臨床症状を呈し安楽死させる日までを潜伏期間として、潜伏期間が短いものほど感受性が高いと規定した。

6. 確定診断

確定診断のため、安楽死させたマウスは全てホルマリンに固定後、実験室内汚染防止のため蟻酸処理を行い、常法によりパラフィン切片を作製、HE染色と免疫組織染色を行った。免疫組織染色はhydrolytic autoclaving 法による前処理の後、一次抗体として抗N末合成ペプチドウサギ血清とモノクローナル抗体3F4を用いた。また一部は上述のウェスタンブロットを行った。

（倫理面への配慮）

全ての繁殖、感染実験は九州大学大学院医学研究院動物実験指針に従い、実験計画書は九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の審査を受け承認されている。動物の苦痛排除・軽減のための具体的方策として接種はエーテル麻酔下で行い、発症した動物に関しては終末期に至る前にエーテル酔下で断首により安楽死させた。

C,D. 結果と考察

ヒト／キメラプリオン蛋白遺伝子発現マウスをプリオン蛋白遺伝子欠損マウス（Prnp0/0）と戻し交配することによってマウスの内在性プリオン遺伝子が発現しない完全なヒト／マウスキメラ遺伝子発現マウス3系統を樹立した。PCRによる遺伝子片増殖と制限酵素切断長（RFLP）による解析の結果、この課程で作られる内在性マウスプリオン蛋白遺伝子をヘミにもったマウス遺伝子（Prnp w/0）、ワイルドマウス遺伝子（Prnp w/w）、ノックアウトベクター遺伝子であるNEO遺伝子と導入遺伝子（Tg）を検出した。また、サザンブロッティングによる解析でも、Tgとノックアウトベクター遺伝子が確認された（図1）。さらに、ウエスタンブロッティングの結果、導入遺伝子に相応してそれらの遺伝子産物としてヒト型のプリオン蛋白が産生されていることが確認された（図2）。材料と方法で示したTg# 30 HuPrP(129Met)、Tg# 12 HuPrP(129Val)、Tg# 21HuPrP(129Val) 3系統のマウスのそれぞれ異なるgenotyoeにsporadic CJD 患者脳乳剤H3を接種した感染実験の成績をTable 1に纏めた。129Met型であるTg# 30のヒトプリオン蛋白のみを産生する系、Tg#30 HuPrP(129Met) + /- ・0/0、では平均156日、最短個体で132日の潜伏期間であった。これはヒトプリオンの直接接種によるマウスの潜伏期間としてはこれまでの最短のグループに属する。マウスワイルドプリオンをヘミに持つライン、Tg# 30 HuPrP(129Met) + / - ・W/ 0は平均215日と延長し、ホモに持つライン、Tg# 30 HuPrP(129Met) + / - ・W/ Wは平均375日であった。また、同じラインでTg をもたない野生型マウスは672日を要してもマウスプリオン病の明確な症状を示さなかった。129Val型のTg# 12でもMet型に比

べて少し遅れるが、Tg# 12 HuPrP(129Val)+/-・0/0、Tg# 12 HuPrP(129Val) +/-・0/w、Tg# 12 HuPrP(129Val) +/-・w/w、Tg# 12HuPrP(129Val)-/-・w/wそれぞれ175日、259日、313日、763日と同様の傾向を示した。Tg21系統に置いても潜伏期間のずれはあるもののTg# 21 HuPrP(129Val) +/-・0/0、Tg# 21 HuPrP(129Val) +/-・0/w、Tg# 21 HuPrP(129Val) +/-・w/w、Tg# 21HuPrP(129Val)-/-・w/wそれぞれ192日、250日、352日、788日であった。これらのことから、Tgの発現量が同じであればマウス内因性のプリオン遺伝子の量に相関して潜伏期間が延長することが明らかになった。すなわち、ヒト型（ヒト／マウスキメラプリオン蛋白遺伝子を導入されたTgマウスの導入遺伝子機能発現においても、内因性マウスプリオン遺伝子は導入ヒトプリオンタンパク遺伝子の機能発現を抑制することが明らかになった。同じようにTg# 30のグループにそれぞれＦ１株を接種すると、全く逆に、-/-・w/w、Tg# 30 HuPrP(129Met) +/-・W/W、Tg# 30 HuPrP(129Met) +/-・W/0、Tg# 30 HuPrP(129Met)+/-・0/0とワイルド（w）の発現量に応じて潜伏期間が短くなり、マウス順化プリオンに対して感受性が高くなった(Table 2)。この導入遺伝子はマウスプリオンタンパク遺伝子のプロモータをそのまま利用し、Sma I からBstEII間のみをヒト型に置き換え、Ｃ末のプロセッシング領域はマウスの遺伝子となっている。したがって、宿主マウス細胞内において同じプロセッシングシステムで導入プリオンタンパク遺伝子が代謝されており、その量が一定であると考えると導入プリオンタンパク遺伝子と内因性プリオンタンパク遺伝子は代謝課程でお互いに競合して、異常プリオンタンパク、すなわちプリオンに変化する際に、その鋳型であるプリオンに対して内因性プリオンタンパク遺伝子と競合することによって異常型プリオンにコンバートされる量が減少すると考えられる。さらに、マウスの内因性リオンタンパクはヒトプリオンでは異常型プリオンタンパクにコンバートされ難く、時間が非常に長いことがW/W遺伝子のみのワイルドマウスの潜伏期間から明白であり、結果として潜伏期間が延長するものと推定できる。一方、マウスのワイルド型プリオン蛋白遺伝子を導入したTgマウスについては、2.0量発現マウス、1.1、1.0（wild control）とTgが多いほど感受性が高くなり、内因性マウスの遺伝子機能発現に相加的に作用することが示唆された(Table3)。このことは導入遺伝子の種類によっては内因性遺伝子の機能が導入遺伝子機能を抑制しない場合もあることを示すものである。この現象は導入遺伝子の構造と内因性遺伝子の相異やプロモーター、イントロン、導入遺伝子産物代謝など、興味深い問題が多く含まれている。次に、Tgの発現量の異なる５系統のＴｇマウスに同じmet/met型患者脳乳剤を接種した結果、Tgの発現量がワイルドマウスのプリオンタンパクの発現量を１とすると、1.2が最も潜伏期間が短く、発現量に応じて潜伏期間が延長することが示された（Table 4）。各系統のTg遺伝子産物の発現は、半定量的ウエスタンブロッティングの結果Tg#30 HuPrP(129Met)ホモ＜Tg# 30 HuPrP(129Met) ヘミ ＜ Tg# 12HuPrP(129Val)＜Tg# 21 HuPrP(129Val)＜Tg#59 HuPrP(129Met)であり、その発現量はワイルドマウスのプリオンタンパク量を基準におよそ0.6、1.2、 2.0、4.0、9.0 であると算定された（図３）。これらの結果から、導入遺伝子の発現量がワイルドマウスの量を越えて過剰になればなるほど潜伏期間が延長する事が明らかになった。したがってわれわれのヒト／マウスキメラ遺伝子発現マウスの系では過剰発現が必ずしも、感受性向上にはならないことが示された。これは、マウスやハムスターのPrPC過剰発現は潜伏期間が短縮するというこれまでの報告と異なった結果である。

E. 結論

１． われわれのヒト/ マウスキメラ型プリオンタンパク遺伝子はマウス内因性ワイルド遺伝子の発現を欠損することにより、ヒトプリオンに対して非常に高い感受性を示した。B. Ｔｇの過剰発現は必ずしも高感受性にならないことが明らかになった。

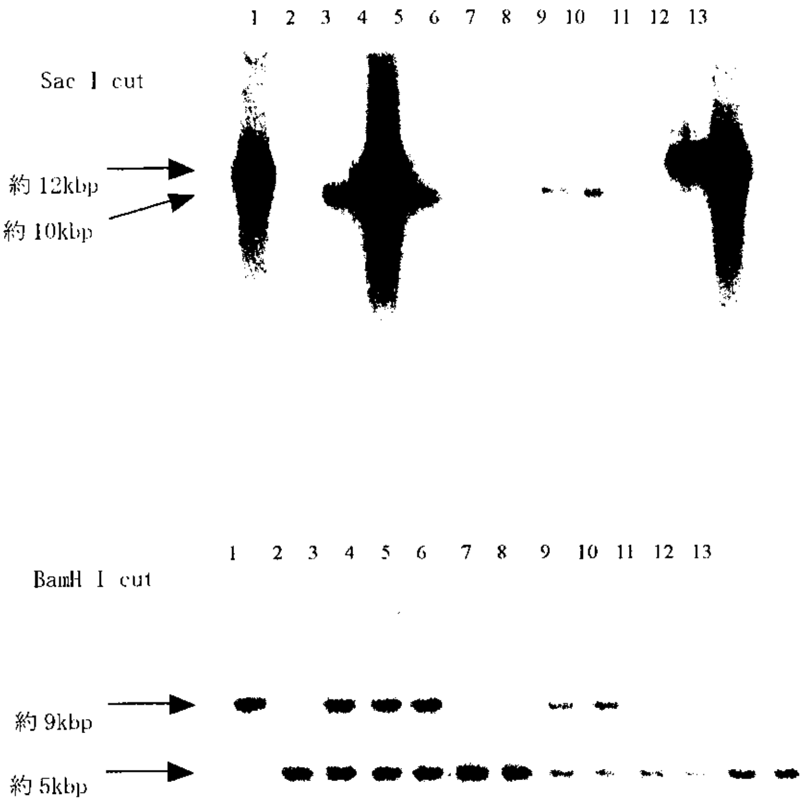
F．［健康危険情報］

特になし。

G．［研究発表］

毛利資郎：. プリオン病の感染予防 脳の科学 Vol.22: 751-756, 2000.

図１． Southern Hybridization による PrP 遺伝子のスクリーニング




1 : Tg・w/w
2 : 0/0
3 : w/0
4 : Tg・w/0
5-12: samples

Lane11.12 が完全ヒト型 Tg□}ウ
Tg・0/0