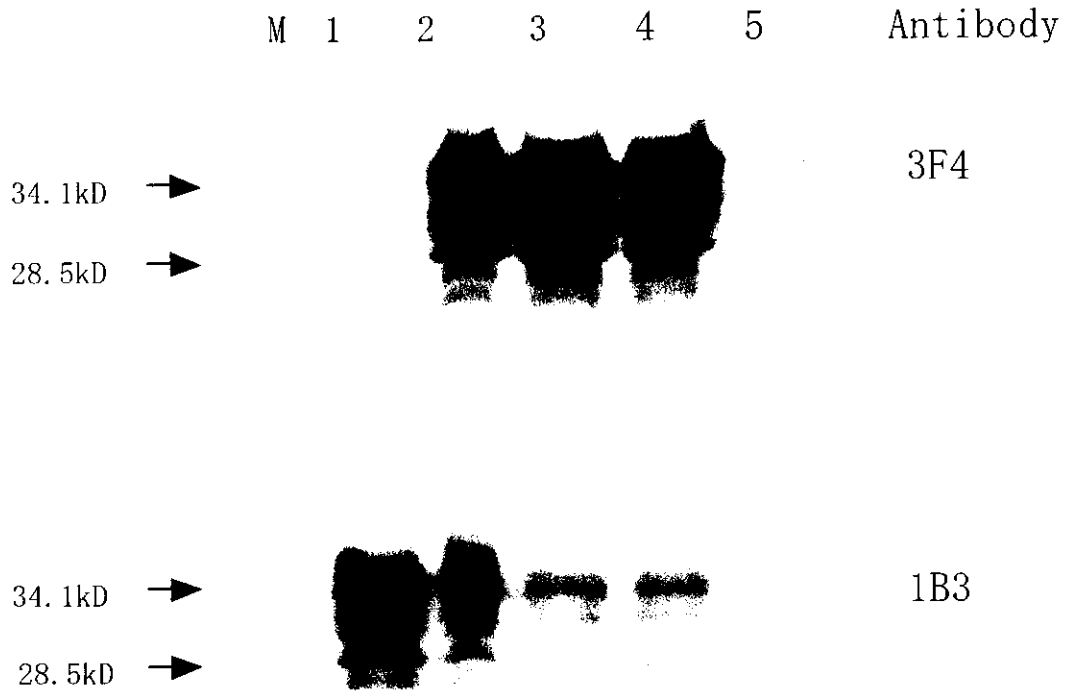
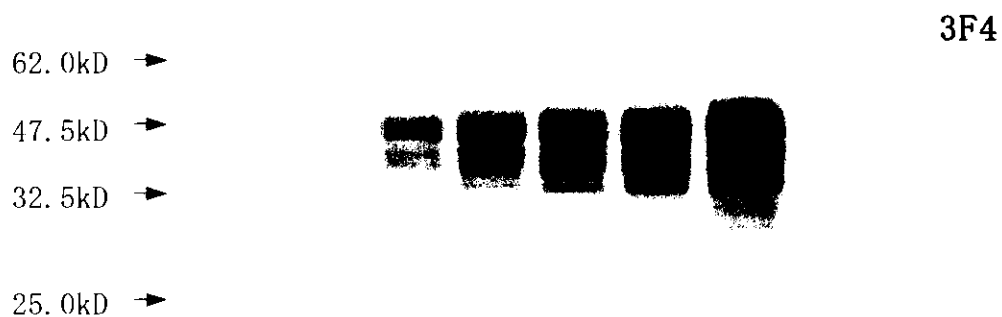
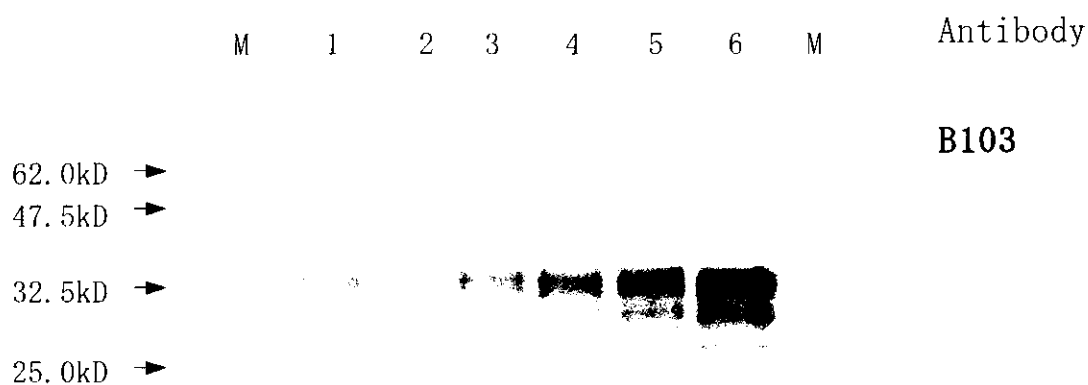


図 2. Western blot analysis of Tg mice



M: Marker  
 1 : Tg#12 -/- · w/w  
 2 : Tg#12 +/- · w/w  
 3 : Tg#12 +/- · 0/0  
 4 : Tg#12 +/- · 0/0  
 5 : Tg#12 -/- · 0/0  
 Lane 1 はマウス型プリオンタンパクのみを産生  
 Lane 2-4 はヒト型プリオンタンパクを産生  
 Lane 5 はプリオンタンパクの産生は認められない

☒ 3. Western blot analysis of Tg mice



M : Marker

1 : NZW	w/w	×1
2 : Tg#30	Mo/Hu (129met) +/- · 0/0	×0.6
3 : Tg#30	Mo/Hu (129met) +/+ · 0/0	×1.2
4 : Tg#12	Mo/Hu (129val) +/- · 0/0	×2
5 : Tg#21	Mo/Hu (129val) +/- · 0/0	×4
6 : Tg#59	Mo/Hu (129met) +/- · 0/0	×9

Table 1. Transmission tests of a human prion to various strains of the transgenic mice

Mouse strain	Mouse genotype	Number of mice	Incubation period	Mo/Hu PrP expression (Compared with wild mouse)
Tg30	Mo/Hu (129Met) +/-0/0	11/11	156 ± 14.2	X 0.6
Tg30	Mo/Hu (129Met) +/-0/0	4/4	147 ± 9.9	X 1.2
Tg59	Mo/Hu (129Met) +/-0/0	2/2	340 ± 8.5	X 9.0
Tg12	Mo/Hu (129Val) +/-0/0	18/18	175 ± 15.3	X 2
Tg21	Mo/Hu (129Val) +/-0/0	3/3	192 ± 4.04	X 4

Inoculated with 10% brain homogenate of codon129 Met/Met patient via i.c.

Table 2. Transmission test of a mouse prior to TgMo transgenic mice

Mouse	Mo PrP expression	Affected/Inoculated	Incubation periods
#22	2.0	6/6	107 ± 6.6
#39	1.1	3/3	154 ± 11.0
Control	1.0	12/12	163 ± 2.4

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  
プリオン病患者の脊髄液中14-3-3蛋白定量系について

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部主任研究者

研究要旨

プリオン病を疑われる患者脊髄液中の14-3-3蛋白の定量を正確にするため、組換え蛋白を発現精製した。ウエスタンブロットによる比較定量により、ガンマアイソタイプがプリオン病において最も境界鮮明に上昇しており、非プリオン病においては10ng/mLを超えて上昇することは極めてまれであると考えられた。また紛らわしい例では採取日を変えたサンプルを測定し測定値の下降を認めることが、プリオン病を否定するために有用であることが判明した。

A. 研究目的

CJDを含むヒトプリオン病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。

B. 研究方法

1. 14-3-3蛋白ガンマ及びベータアイソタイプの融合蛋白を大腸菌にて発現させ、それぞれ精製した。

2. ガンマ及びベータアイソタイプ特異的なペプチドを抗原とするポリクロナール抗体の、組換え蛋白に対する特異性をウエスタンブロットによって調べた。

3. アイソタイプ特異性ポリクロナール抗体を使用してプリオン病が疑われるヒト脳脊髄液中の14-3-3蛋白及び組換え蛋白を同時に測定し、比較定量した。

C. 研究結果

1. ガンマアイソタイプ特異的抗体はガンマアイソタイプへの反応性が高く、またベータアイソタイプに対する反応性が低く特異性の高いことを示した。ベータアイソタイプ特異的抗体はベータアイソタイプへの反応性自体が低く、またガンマアイソタイプも同様に認識し、特異性の低いことが判明した。

2. ガンマアイソタイプはベータに比べ、プリオンと非プリオン病の定量値の境界が比較的鮮明であり、非プリオン病では10 ng/mLを超えないことが判明した。

3. プリオン病においては一般に50 ng/mLを超えていた。紛らわしい場合、時間を隔てたサンプル定量により、非プリオン病の場合低下することが判明した。

4. 比較的緩やかな経過を示す遺伝性のプリオン病においても判定に14-3-3蛋白ガンマアイソタイプが上昇していることが判明した。

D. 考察

ベータアイソタイプに対する抗体は反応性とともに特異性にも乏しいこと、ガンマアイソタイプに対する抗体は反応性、特異性ともに高いことが判明した。実際のプリオン病が疑われる症例では、脊髄液中14-3-3蛋白定量においてガンマアイソタイプ量がプリオン病とよく相関するすることが判明した。その境界線はいまのところ10 ng/mLであると考えられる。さらに確かな早期診断法とするために正常及び、非プリオン病患者脊髄液の定量が必要であると考えられた。

E. 結論

ガンマアイソタイプ特異抗体と組換え蛋白の比較定量により、脊髄液中の14-3-3蛋白定量は早期診断法として、信頼できるテストになりつつあると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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(3):395-398. 2000

2. 学会発表

なし。

G.知的所有権の取得状況

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  
ヒトプリオン蛋白質に対する単クローン抗体の作製

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を特異的に検出する高感度検出系の確立のために、ヒトプリオン蛋白質を特異的に認識する単クローン抗体の作製を試みた。マウス細胞株にヒトプリオン遺伝子を導入することで、安定にヒトプリオン蛋白質を発現する細胞株を樹立し、これを抗原としてマウスを免疫した。IgGの産生でスクリーニングし、蛍光抗体法でヒトプリオンタンパク質を認識する単クローン抗体が得られたが産生は一過性で、安定したハイブリドーマは得られなかった。また、His-Tag を付けたリコンビナントプリオンタンパクをCos7細胞に発現させ、ニッケルをコートしたプレートを用いることで抗原特異的な抗体スクリーニングが可能になった。

A. 研究目的

new variant CJDの感染者が80名を超え、また動物実験によってBSE由来のプリオン病は発症前であっても輸血によって感染する場合があることが報告された。ヒトでも輸血によって、同様な感染が生じる可能性は否定できない。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

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4回免疫した。また、ヒトプリオン蛋白質のC末にhistidineがタグとして6ヶ付くりコンビナント蛋白質をCos7細胞に発現させ、nativeな条件で可溶化し、ニッケルをコートしたプレートに添加した。このプレートに得られた抗血清を反応させ、抗体の力価を検索した。高い抗体価を示したマウスから脾細胞を取り、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマはIgGの産生でスクリーニングし、陽性のクローンは蛍光抗体法で特異性を確認した。

C. 研究結果

Cos7細胞に発現させたhistidineのタグを付けたリコンビナントヒトプリオン蛋白質はtween20によって可溶化でき、ニッケルがコートされているEIAプレートにニッケルを介して結合させることに

よってヒトプリオン蛋白質に対する抗体を検出できるようになった。細胞株を用いて免疫した結果得られた抗血清は、図1に示すように、ペプチドで免疫した場合より高い傾向を示した。細胞株で免疫した場合には、免疫した全てのマウスで低いながらもnativeなプリオン蛋白質を認識する抗体が得られた。一方、ペプチドで免疫したマウスではペプチドに対しては反応性が認められるものの、nativeな抗原に対しては大部分のマウスの抗血清は認識しなかった。例外的に、高力価のためハイブリドーマを作製したマウスはnativeの抗原も認識していた。B10マウスとBalb/cマウス間では抗体の力価に差が認められなかった。細胞株で免疫したマウスの内、高い力価を示したマウスからハイブリドーマを作製した。IgG産生の認められたハイブリドーマの上清を用いて、蛍光抗体法を用いて認識する抗原の部位を解析したところ、細胞質に存在するプリオン蛋白質を認識する上清と細胞膜に存在するプリオン蛋白質を認識すると思われる各々のハイブリドーマを得た。安定した細胞株を得ようと試みたが最終的にはこれらの抗体をつくる細胞株は消失した。

D. 考察

histidineがタグとして付いたリコンビナントプリオン蛋白質をCos7細胞に発現させ、nativeな条件で可溶化し、ニッケルをコートしたプレートを用いることで、精製をしないでプリオン蛋白質をEIAプレートにコートすることが可能になった。Cos7細胞に発現させることで、糖鎖が付いた状態の抗原として抗体をスクリーニングすることができた。これによ

て、ペプチドで免疫した場合に得られる抗体がペプチドのみを認識するものか、nativeなプリオン蛋白も認識する抗体か、区別できるようになった。一方、発現している細胞株で免疫したほうがnativeな抗原を認識する抗体が得易いことはわかったが抗体価が低かった。これを改善するためには、精製した抗原を用いた免疫が必要と思われるので、現在抗原の精製を進めている。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。そこで、ニッケルプレートにプリオン蛋白をコートし、ビオチン化した細胞由来の蛋白とのバインディングを予備的に検討している。これまで、ラミリンやプラスミノーゲンなどが報告されているが、白血球が感染性を示すことが知られているので白血球細胞に特異的なリガンドの存在の可能性もあり検索を予定している。

#### E. 結論

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。単クローン抗体を作製したところ、細胞質のプリオン蛋白や細胞膜に存在するプリオン蛋白を各々認識すると推定されるクローンが得られたが、クローニングの過程で消失した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Naito, S., Y. Okada, M. Takahashi, H. Kato, M. Taneichi, 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.

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. 2000. フィブリン接着剤の役割と安全性. *Surgery frontier*. 7:95-100.

##### 2. 学会発表

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

年。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし



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  
プリオン病の早期診断に関する研究

分担研究者 西島正弘 国立感染症研究所 細胞化学部長

研究協力者 山河芳夫 国立感染症研究所 細胞化学部

研究協力者 神山恒夫 国立感染症研究所 獣医科学部

マウス順化スクレービー（帯広1株）投与マウスの脳、脾臓、白血球における異常プリオン（プロテイナーゼK抵抗性プリオンタンパク（Prpres））の蓄積の経時変化をウェスタンブロット（WB）法で検討した。投与ルートに関わらず、Prpresの脾臓への蓄積が脳への蓄積に先立って認められた。白血球におけるPrpresの検出をこころみたが、WB法での検出は困難であった。

A. 研究目的

異常プリオンタンパクの微量検出及びプリオン病の早期診断を目的として、マウス順化スクレービー（帯広1株）投与マウスの脳、脾臓、白血球におけるPrpresの蓄積の経時変化をWB法で検討した。

B. 研究方法

4週令のICRマウス（雌）に病原体（感染脳の細胞膜画分）をそれぞれ、経脳（脳室）、腹腔内、経口投与(3?g)し、経時的に脳、脾臓、白血球の細胞膜画分に含まれるPrpresをWB法で検出した。検出に用いた一次抗体は6H4（マウスmAb、プリオニクス社）及び当所で作成したP8（ウサギポリクローナル抗体）を用いた。両者はそれぞれプリオンタンパクの144-152、92-109のペプチド配列を認識する。感染実験は鑑賞研究所の動物実験委員会の動物実験指針に従って実施した。

C. 研究結果

Prpresの脳への蓄積は脳室内投与で最も早く認められ（平均120日）、ついで腹腔内投与（平均230日）、経口投与（260日）の順であった。脳室内投与と腹腔内投与ではPrpresの蓄積量と蓄積に要する日数は比較的均一であったが、経口投与では量と日数ともにバラツキが認められた。一方、投与ルートに関わらず、Prpresの脾臓への蓄積が脳への蓄積に先立って認められた。即ち、脳室内投与では接種後30日、経口投与では接種後60日ですでに脾臓でPrpresを検出することが出来た。また、脾臓に蓄積するPrpresは脳へのPrpresの蓄積が認められるよう

になると減少する傾向が認められた。さらに、白血球膜を用いてPrpresの検出を試みたが、何れの場合でもPrpresの検出は出来なかった。

D/E 考察/ 結論

リンパ系組織のPrpresの検出がプリオン病の早期診断に有効であることが示唆された。今後、抗体磁気ビーズによるプリオンタンパクの効率的な補足と、ペプチドとプリオンタンパクの抗体への競合反応を利用して白血球のPrpresをキャピラリー-LC/質量分析システムで高感度に検出する方法を検討する予定である。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表（総説）

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”（2000）脳科学 22、731-736

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し

2. 実用新案登録 無し

3. その他 無し

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

プリオン病の診断技術の開発に関する研究  
-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-

棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究協力者 菊池裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部  
山崎壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部

研究要旨

食品、医薬品及び医療用具等の異常プリオン蛋白質の汚染を防ぐために、従来の方法よりも高感度で簡便・迅速なプリオン蛋白質の検出法の開発を目的とし、抗プリオンペプチド抗体を用いた EIA の確立を行った。抗体はウシ及びヒトのプリオン蛋白質に相当するペプチドを免疫原として調製したマウス・モノクローナル抗体またはウサギ・ポリクローナル抗体を、抗原には $\beta$ -galactosidase で標識したペプチドをそれぞれ用い、抗体と酵素標識ペプチドの抗原-抗体複合体を形成させ、96 穴プレートの固相に結合させた抗マウスまたは抗ウサギ IgG 抗体で捕捉し、その酵素活性を 4-methylumbelliferone を基質として蛍光強度を測定した。この EIA は迅速な測定が可能で、標準品として免疫原を用いた阻害実験では、従来の競合的 ELISA の 1,000 倍も高感度な測定値を示し、その有用性が示唆された。

A. 研究目的

食品、医薬品及び医療用具の安全性を確保するため、伝達性海綿状脳症の原因物質である異常プリオン蛋白質の簡便・迅速で高感度な検出法の開発が望まれている。本研究ではプリオン蛋白質の標準試験法の確立を目的とし、次の項目について検討した。

1. プリオン蛋白質標準品として、組換え蛋白質の調製
2. 抗プリオンペプチド抗体を用いた競合的 ELISA の確立
3. 抗プリオンペプチド抗体を用いた EIA の確立

B. 研究方法

1. ウシ組換えプリオン蛋白質の調製

ホルスタイン系ウシ大脳から mRNA を抽出し、RT-PCR 法でウシ・プリオン蛋白質 cDNA のコード領域配列を調製し、pBlueScriptII SK (+)に組み込んだ。得られた配列は、品川らのグループが報告した pPCJY1 (Accession# D10613; Yoshimoto, *et al.*, *Virus Genes* 6: 343-356, 1992)と一致した。次に、Met-Ser-BoPrP (25-241)をコードする DNA (*Nde* I-Met-Ser-BoPrP (25-241)-*Hind* III)を pET23b に挿入し、発現プラスミドを構築した。これを *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS に導入した。1 mM IPTG 存在下で培養した大腸菌から封入体を調製し、8 M 尿素で可溶化し、 $\text{Cu}^{2+}$ キレートカラムに吸着させ、100 mM イミダゾールで溶出した。これを尿素濃度を順次下げながら透析して巻き戻し処理を行い、可溶性ウシ組換えプリオン蛋白質を得た。菌体から得た封入体と精製したウシ組換えプリオン蛋白質の SDS 電気泳動した結果を図 1 に示した。イミダゾール溶出画分は CBB-250 染色で 27 kDa のバン

ドを示し、この値は構築した発現プラスミドのアミノ酸配列から推定される分子量 23.7 kDa とほぼ一致した。また、ウシ・プリオン蛋白質のアミノ酸 146-159 残基に相当するペプチド(bPrP (149-159))を免疫原として調製したマウス抗ウシ・プリオンペプチド・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)が、得られたウシ組換え蛋白質をイムノプロット法で認識することを確認した。

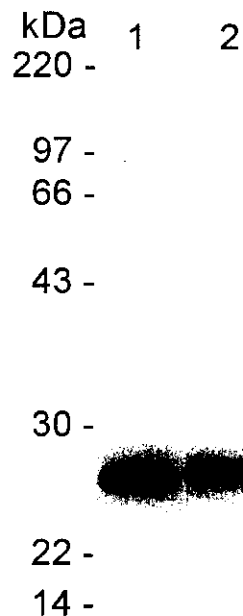


図 1. ウシ組換えプリオン蛋白質の SDS-PAGE  
lane 1. 大腸菌封入体, lane 2. 巻き戻し処理して得られた組換え蛋白質

## 2. 競合的 ELISA

ELISA は常法に従って行った。固相抗原としてウシ組換えプリオン蛋白質またはプリオンペプチド-オブアルブミン(OVA)複合体を、1次抗体として BSPX-54 抗体またはヒト・プリオン蛋白質のアミノ酸 95-114 残基に相当するペプチド hPrP (95-114) を免疫原として調製したウサギ抗ヒト・プリオンペプチド・ポリクローナル抗体 HPN1 を、2次抗体として  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal)標識抗マウス IgG 抗体または抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれ用い、固相に結合した酵素の活性を基質として 4-methylumbelliferone (4-MUG)を用いて蛍光強度として測定した。阻害実験には、標準物質としてウシ組換えプリオン蛋白質、bPrP (149-159)及び hPrP (95-114)を用いた。

## 3. EIA

本研究で構築した EIA の概略を図 2 に示した。

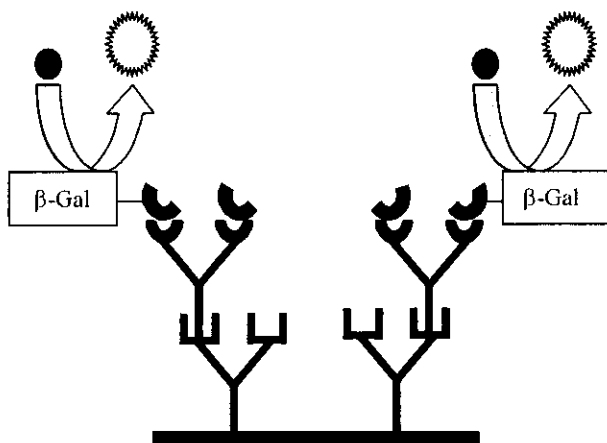


図 2 抗プリオンペプチド抗体を用いた EIA

抗プリオンペプチド抗体には BSPX-54 抗体及び HPN1 抗体を用いた。これらの抗体の免疫原として用いたペプチドを  $\beta$ -Gal で標識し、酵素標識抗原  $\beta$ -Gal-bPrP (146-159)及び  $\beta$ -Gal-hPrP (95-114)を調製した。抗体と酵素標識抗原による抗原-抗体複合体を形成させ、96 穴プレートの固相に結合させた抗マウス IgG 抗体または抗ウサギ IgG 抗体で捕捉し、固相に結合した酵素の活性を基質として 4-MUG を用いて蛍光強度として測定した。阻害実験には、標準物質としてウシ組換えプリオン蛋白質、bPrP (146-159)及び hPrP (95-114)を用いた。

## C. 研究結果

### 1. マウス抗ウシ・プリオンペプチド・モノクローナル抗体 BSPX-54 を用いた競合的 ELISA と EIA

固相抗原として bPrP (146-159)-OVA 及びウシ組換えプリオン蛋白質を用い、ELISA による BSPX-54 抗体の抗体価の測定を行った。本実験に用いた ELISA の条件下で、BSPX-54 抗体はウシ組換えプリオン蛋白質を認識し、免疫原として用いたペプチドを固相抗原とした ELISA と同程度の抗体価を示した。

BSPX-54 抗体の反応性を検討するため、標準物質として bPrP (146-159)及びウシ組換えプリオン蛋白質を用いた阻害実験を行った。先の ELISA で 50%最大結合量を示した抗体量を用い、固相抗原のウシ組換えプリオン蛋白質に対する BSPX-54 抗体の結合を阻害する標準物質として bPrP (146-159)を用いた競合的 ELISA の結果を図 3 に示した。免疫原として用いた bPrP (146-159)は 10 nM から 1  $\mu$ M で阻害活性を示し、50%の阻害活性を示す阻害物質の濃度(IC<sub>50</sub>)は 15 nM であった。しかし、ウシ組換えプリオン蛋白質は、実験に用いた濃度(約 800 nM)では阻害活性を示さなかった。

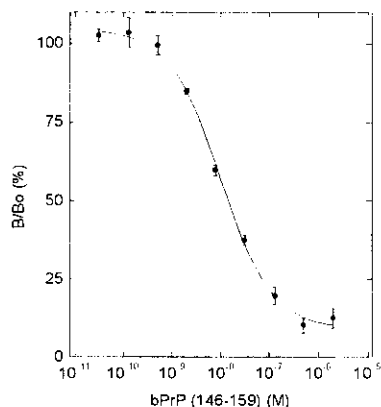


図 3 ウシ・プリオンペプチド bPrP (149-165)を用いた競合的 ELISA

次に、酵素標識抗原として  $\beta$ -Gal-bPrP (146-159)を用い、EIA による BSPX-54 抗体の抗体価の測定を行った。本実験に用いた EIA の条件下で、BSPX-54 抗体は酵素標識ペプチドを抗原として認識した。そこで、BSPX-54 抗体の EIA における反応性を検討するため、標準物質として bPrP (146-159)及びウシ組換えプリオン蛋白質を用いた阻害実験を行った。先の EIA で 50%最大結合量を示した抗体量を用い、酵素標識抗原の  $\beta$ -Gal-bPrP (146-159)に対する BSPX-54 抗体の結合を阻害する標準物質として bPrP (146-159)を用いた EIA の結果を図 4 に示した。免疫原として用いた bPrP (146-159)は 1 nM から 100 nM で阻害活性を示し、その IC<sub>50</sub>は 10 nM であった。しかしながら、ウシ組換えプリオン蛋白質は、実験に用いた濃度(約 400 nM)では阻害活性を示さなかった。

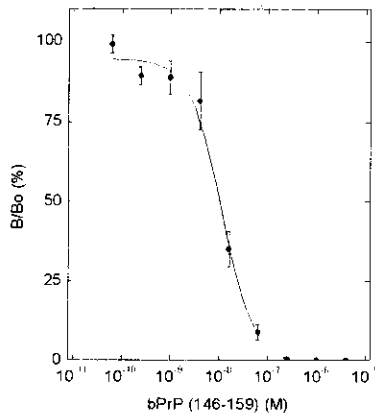


図4 ウシ・プリオンペプチド bPrP (149-165)を用いた EIA

## 2. ウサギ抗ヒト・プリオンペプチド・ポリクローナル抗体 HPN1 を用いた競合的 ELISA と EIA

BSPX-54 抗体と同様に、固相抗原として hPrP (95-114)-OVA を用い、ELISA による HPN1 抗体の抗体価の測定を行った。本実験に用いた ELISA の条件下で、HPN1 抗体は固相抗原を認識した。

HPN1 抗体の反応性を検討するため、標準物質として hPrP (95-114)を用いた阻害実験を行った。先の ELISA で 50%最大結合量を示した抗体量を用い、固相抗原の hPrP (95-114)-OVA に対する HPN1 抗体の結合を阻害する標準物質として hPrP (95-114)を用いた競合的 ELISA の結果を図 5 に示した。免疫原として用いた hPrP (95-124)は 10 nM から 1 μM で阻害活性を示し、その IC<sub>50</sub> は 400 pM であった。

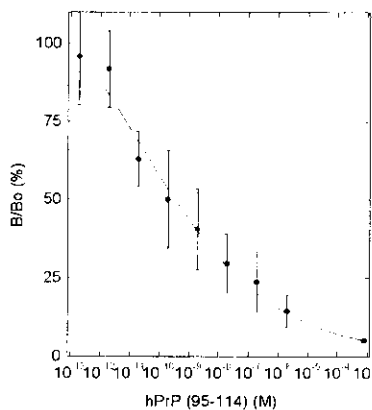


図5 ヒト・プリオンペプチド hPrP (95-114)を用いた競合的 ELISA

次に、酵素標識抗原としてβ-Gal-hPrP (95-124)を用い、EIA による HPN1 抗体の抗体価の測定を行った。本実験に用いた EIA の条件下で、HPN1 抗体は酵素標識ペプチドを抗原として認識した。そこで、HPN1 抗体の EIA における反応性を検討するため、標準物質として hPrP (95-124)を用いた阻害実験を行った。先の EIA で 50%最大結合量を示した抗体量を用い、酵素標識抗原のβ-Gal-hPrP (95-124)

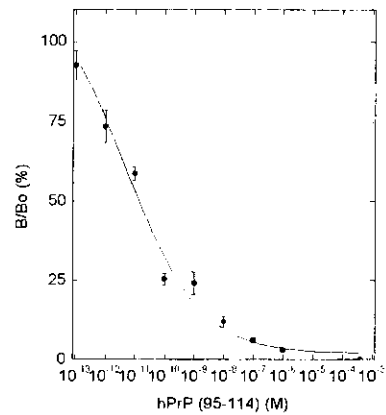


図6 ヒト・プリオンペプチド hPrP (95-124)を用いた EIA

に対する HPN1 抗体の結合を阻害する標準物質として hPrP (95-124)を用いた EIA の結果を図 6 に示した。免疫原として用いた hPrP (95-124)は 0.1 pM から 100 nM で阻害活性を示し、その IC<sub>50</sub> は 15 pM であった。

## 3. ヒト・プリオン蛋白質標準物質の調製

ヒト・プリオン蛋白質の標準物質を確保する目的で、ヒト・グリオーマ細胞株 T98G から RNA を抽出した。現在、RT-PCR 法で PrP の cDNA をクローニングを進めている。今回報告したウシ組換えプリオン蛋白質と同様に、大腸菌での発現系を早急に構築する予定である。

## D. 考察

食品、医薬品及び医療用具等の異常プリオン蛋白質の汚染を防ぐために、高感度なプリオン蛋白質の検出法を確立する必要がある。従来より、高感度な検出法としては蛋白質の特異抗体を用いた競合的 ELISA 及びサンドイッチ EIA が知られており、様々な物質の検出法に用いられてきた。競合的 ELISA は、被験物質である抗原が特異抗体と結合し、抗体と固相抗原からなる抗原抗体複合体形成を阻害する作用を利用した方法で、低分子量のハプテン等の測定法に利用されている。しかし、高分子量の蛋白質等の測定には適さない例が、多数報告されている。その原因として、抗原抗体反応が固相上で起こるため、高分子量の蛋白質は抗体と固相間で立体障害を起こし、抗原抗体複合体形成を阻害しにくいことや、液相の抗原より固相の抗原を認識しやすい抗体の使用に起因すると考えられる。一方、サンドイッチ EIA は 2 種類の特異抗体を用いる方法で、固相上の第 1 抗体が被験物質である抗原の一端を捕捉し、液相中の第 2 抗体が他端に結合したサンドイッチ状の抗原抗体複合体を形成させる。従って、多価のエピトープを有する高分子量の蛋白質等の検出法として利用されている。しかし、被験物質が哺乳類間でアミノ酸配列が高く保存されているために抗原性が低い

蛋白質の場合には、適した 2 種類の特異抗体を得る難しさから、サンドイッチ EIA の構築が困難なことが多い。

以上の方法に比較して、今回報告した被験物質と特異抗体の抗原抗体複合体を固相に結合させた特異抗体で捕捉する EIA は、次の利点が挙げられる。第 1 に、抗原抗体複合体が液相で形成されるため、低分子から高分子まで適用可能であること。第 2 に、1 種類の特異抗体があれば測定系を構築可能であること。第 3 に、測定操作の短縮が図れること。以上のことから、この EIA では免疫沈降が可能な全ての抗ペプチド抗体に適用が可能と考えられる。

本報告で特異抗体としてマウス抗ウシ・プリオンペプチド・モノクローナル抗体 BSPX-54 を用いた EIA では、ウシ・プリオンペプチドは阻害活性を示したが、ウシ組換えプリオン蛋白質は阻害活性を示さなかった。これは、本抗体が ELISA やイムノブロット法では固相抗原としてのプリオン蛋白質を認識したが、免疫沈降では認識しなかった実験結果と整合性がある。一方、ウサギ抗ヒト・プリオンペプチド・ポリクローナル抗体を用いた EIA では、ヒト・プリオンペプチドは阻害活性を示した。本抗体は、既に免疫沈降に適用可能なことを確認しており、1 pM 以下の濃度でヒト・プリオンペプチドが阻害活性を示すことから、高感度なプリオン蛋白質検出法の構築が期待される。現在、標準物質として用いるヒト組換えプリオン蛋白質の調製を進めている。その他、既存の各種抗プリオンペプチド抗体のペプチドを合成し、高感度な EIA に適用可能な抗体の探索も進めている。

以上の計画に合わせて、次年度以降は各種抗体を用いたプリオン蛋白質の濃縮法を検討し、食品、医薬品及び医療用具等のそれぞれの被験試料に適した前処理方法の構築に着手する予定である。

## E. 結論

平成 12 年度は、抗プリオンペプチド抗体を用いた EIA の構築を試みた。標準物質としてウシ・プリオンペプチド及びヒト・プリオンペプチドを用いて阻害実験を行い、従来の競合的 ELISA より有用な検出系となり得る可能性を見いだした。ウシ組換えプリオン蛋白質を調製し、標準物質として阻害実験を行った結果、今回用いた条件下の EIA では、マウス抗ウシ・プリオンペプチド・モノクローナル抗体 BSPX-54 は反応性を示さなかった。現在、ウサギ抗ヒト・プリオンペプチド・ポリクローナル抗体 HPN1 を用いた EIA の有用性を確認するため、ヒト組換えプリオン蛋白質の調製を進めている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

学会発表

Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Imazawa, T., Takekida, K., Nishikawa A., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K. and Sawada, J. HIGH-LEVEL EXPRESSION OF CELLULAR FORM OF PRION PROTEIN IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINE T98G. Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting, November 4-9, 2000

武木田薫、菊池裕、山崎壮、品川森一、高鳥浩介、谷村顕雄、棚元憲一、澤田純一：抗ペプチド抗体を用いたプリオン蛋白質の高感度検出法の開発、日本薬学会第 121 年会、2001 年 3 月 28 日—30 日、札幌

山崎壮：プリオン感染と検出法、日本薬学会第 121 年会、2001 年 3 月 28 日—30 日、札幌

### III.研究成果の刊行に関する一覧表

- 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. *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. *EAIBO 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
- Kawahara 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.T., Aneichi 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-scld 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

#### IV.研究成果の刊行物、別刷

**20000509**

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。