

200/0705

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 品川 森一

平成14年(2002)4月

目 次

I. 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	1
品川森一	
II. 分担研究報告書	5
1. 免疫磁性ビーズを用いた PrPSc 検出法の開発	6
品川 森一 (帯広畜産大学獣医公衆衛生)	
2. BSE サーベイランス確定検査用迅速ウエスタンブロット法の改良	10
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)	
3. CJD 脳における正常型プリオン蛋白と異常型プリオン蛋白	17
北本 哲之 (東北大学医学部 病態神経学講座)	
4. 実験動物を用いたプリオンバイオアッセイ法の研究	20
毛利 資郎 (九州大・大学院・実験動物学)	
5. オリックス型プリオン遺伝子を発現しているトランスジェニックマウス に関する研究	24
小野寺節 (東京大学農学部応用免疫)	
6. プリオン・バイオイメージング法の開発に関する基礎研究	25
堂浦 克美 (九州大学・大学院・脳研病理)	
7. BSE 検体の迅速で正確な免疫染色法の検討	28
高橋 秀宗 (国立感染症研究所 感染病理部)	
8. プリオンタンパクと結合する細胞由来タンパクの検索	30
岡田 義昭 (感染症研究所 細菌血液製剤部)	
9. プリオンタンパク質の competitive assay による定量	33
西島正弘・山河芳夫 (国立感染症研究所細胞化学部)	
10. Proteinase K 処理抵抗性プリオン蛋白質の調製	34
菊池裕 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	38

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
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

(1)昨年 BSE の発生にともない、サーベイランス確定検査が免疫染色及びウェスタンブロット法を用いて実施されることとなり、緊急課題として迅速化の改良を行った。成果を基に作製したプロトコールは現在検査機関で使用されている。

(2)検出感度向上と、検出法の改良・開発のために、抗プリオン、抗プリオン蛋白モノクローナル抗体の作製を継続し、有用な抗体が幾つか得られた。これら抗体を用いたサンドイッチ ELISA が完成した。現在検査に用いられているキットに比べ感度の点で遜色なく、簡便な点すぐれている。また、免疫磁性ビーズ ELISA 及び抗体・PrP 抗原ペプチド複合体結合ビーズを用いた競合 PrP 測定法を開発した。本年度得られた、抗プリオン抗体は正常 PrP と反応しないため、新たな高感度検出法開発に有用と考えられる。

(3)標準品として使用するヒト正常及び異常プリオン蛋白の代替品として、細胞株 T98G の細胞周期を検討して得られることが明らかになった。

(4)非侵襲的なプリオン・バイオイメージング法の基礎研究として、Congo・red 関連化合物である BSB をプローブとして生体内のプラーク型異常プリオン蛋白を描出することに成功した。

(5) PrP^{Sc} と PrP^C の量の比較を行い、CJD 脳は PrP^C が少量しか存在しないことが判った。

(6)血液中の PrP と結合する細胞蛋白を探したが、確認できなかった。

(7)全ヒト型 PrP 発現マウスは発現量が増すと感受性が高くなり、ノックインマウスではキメラ型も全ヒト型も脾臓、リンパ節に極初期に異常プリオン蛋白の沈着が起きた。

(8)シロオリックス(Or)PrP 遺伝子導入マウス Tg(ORPrP+/+) Prmp0/o と KO マウスの mating を行ない、妊娠、出産が行なわれた。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

品川 森一・帯広畜産大学・教授
堀内 基広・帯広畜産大学・助教授
北本 哲之・東北大学・教授
小野寺 節・東京大学・教授
毛利 資郎・九州大学・教授
高橋 秀宗・感染症研究所・主任研究者
岡田 義昭・感染症研究所・室長
西島 正弘・感染症研究所・部長
菊池 裕・食品医薬品研究所・主任研究者

研究協力者氏名・所属機関及び所属機関における職名

堂浦 克美・九州大学・助教授

A. 研究目的

血液製剤、医薬品、畜産食品、生体材料を対象に免疫生化学的手段及びバイオアッセイによってプリオンの検出あるいは疾病に付随する蛋白を検出して診断・摘発する方法の改良と、高感度化及び実用化を図り、プリオン病のヒトへあるい

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) PrP^{Sc} の免疫学的検出法

- 抗体の良否による、検出感度向上、検出法の改良・開発が大きく影響を受けることが判ったため、組換え PrP 及び感染性プリオンによる免疫と、得られた mAb の性状解析を行った。
- 前年度に開発してサンドイッチ ELISA の系を用いて、試料調整法の検討等を行うの開発を行った。
- 免疫磁性ビーズに結合した合成ペプチドが PrP^{Sc} を添加により解離してくるペプチド量を測定する競合 ELISA による PrP^{Sc} の定量が可能か検討した。
- 検出系の標準品としてのヒト異常プリオン蛋白を得るため、培養細胞の培養条件を検討した。
- 血液細胞表面に存在する、プリオンと相互作用する蛋白検出を標識 PrP をプローブとして検出を行った。

2) バイオアッセイによる PrP^{Sc} の検

出

- a) 全ヒト型 PrP 遺伝子をコックインにより導入したマウスにヒトプリオンの感染を行い潜伏期の測定および細網リンパ系組織のプリオン沈着を経時的に検討した。
 - b) シロオリックス PrP 遺伝子発現トランスジェニックマウスから、交配により該遺伝子を Pm⁰⁰ マウスに移した。
- 3) 非侵襲的なプリオン・バイオイメージング法の基礎研究

Congo・red 関連化合物 BSB をプローブ候補として、プリオン病発症マウスの脳切片上での結合、及び末梢投与による脳内の異常プリオン蛋白との結合を検討した。

- 4) その他: プリオン病発症脳内の PrP^{Sc} と PrP^C の測定

PrP^{Sc} と PrP^C の界面活性剤による溶解性の差を利用して、可溶性の PrP^C を分別濾過し、ウエスタンプロット法で定量した。

(倫理面への配慮)

実験動物使用時は各機関の動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施し、使用動物数は必要最小限に止めている。

C. 研究結果

抗体の作製

得られた抗組替え PrP 18mAb、抗未変性マウス PrP^{Sc} 15 mAb は認識エピトープの違う 8 群と PrP^{Sc} の構造を認識する 1 つの合計 9 群に分けられた。ウエスタンプロット及び ELISA で反応性の高い 3 つの mAb は検出系の感度向上に有用であることが判った。PrP^{Sc} の構造を認識する抗体は新たな検出系の開発等に有用なことが予想される。

検出系の検討

ウエスタンプロット法及び免疫組織化学の迅速化を計った。ウエスタンプロット法では主として試料調整法及びプロテイングに付いて検討し 8 時間以内で終了しかつスクリーニング法の 4 倍程度高い感度が確保できた。免疫染色では主として固定法と染色法を検討し、成績に影響を与えることなく、積算時間で 11 無いし 12 時間で終了可能となった。

サンドイッチ ELISA に mAb を用いることにより、遠心操作を省いて作製した被験試料を用いてもウエスタンプロット法の倍以上の感度が得られた。より操作が簡単な検出系として免疫磁性ビーズ ELISA を開発した。しかし、バックグラウンド値が高いため、検出感度はウエスタンプロット法の半分程度で、バックグラ

ンドを低下させるという課題が残った。競合 ELISA により、溶出したペプチドの定量から PrP^{Sc} を定量できた。しかし、感度がおよそウエスタンプロット法と同等であるため、感度の向上が課題である。

ヒトのグリオブラストーマ T98G を G1 期に止めると PrP^{Sc} 様の PK 抵抗性の PrP が蓄積することが判った。このことから、培養条件を替えることにより、PrP^C 及び PrP^{Sc} 様のプリオン蛋白の標準品を得ることが可能となった。

血液中のプリオン検出を目的として、血液細胞の細胞表面に存在するプリオンと親和性を持つ蛋白の検出を試みたが成功しなかった。

バイオアッセイ

ヒト PrP 遺伝子をノックインで導入したマウスはヒトプリオンに対し種の壁が無く、しかも野生型のマウスと同様に感染早期から細網リンパ系組織にプリオンが蓄積することが判った。

シロオリックス PrP 遺伝子を導入したマウス PrP 遺伝子欠損マウスの繁殖が進み、感染試験ができる段階になった。

その他

スクレイピーマウスモデルでは発症したマウスの脳内の PrP^C 量が減少することが知られている。CJD の患者脳内の PrP^C と PrP^{Sc} の量的なことは未知であった。界面活性剤可溶性で濾過膜透過性を指標に PrP^C を調べた所、PrP^C の量が減少していることが判った。

D. 考察

プリオン病の診断にはプリオンを免疫学的に、あるいはバイオアッセイによって検出することが行われている。免疫学的に高感度化を計るためにはより優れた抗体が必要であり、かなり満足できる mAb が幾つか得られた。また、世界で第二番目ではあるがプリオンの構造を認識する抗体が得られ、将来の各種研究の有用な道具となると予想される。

我が国の BSE の確認検査にはウエスタンプロット法と免疫染色が併用されている。このため、緊急に迅速化と感度の向上が求められ、解決できた。また、サンドイッチ ELISA も現在市販されているキットを凌駕する系が完成されたため、経済性のみならず、感度の点でも国産のキットも将来検査にも用いられる可能性がでてきた。

バイオアッセイでは実験動物を用いた際の種の壁が感度と、潜伏期の延長に働き、ネックとなっていた。遺伝子改変マウス

を作製することにより、ヒトプリオン病では種の壁が解消した。さらにノックインマウス作製により、細網リンパ系組織に PrP^{Sc} が早期から蓄積するため、この検出を組み合わせることによりバイオアッセイの期間飛躍的に短縮可能となった。現在の所、シロオリックス PrP 遺伝子導入マウスの感染試験が行われていないため、動物プリオン病の有用な遺伝子改変モデル動物が完成していない。

現在プリオン病は組織を検査しなければ確定診断ができないが、非侵襲的なプリオン・バイオイメージング法が開発されれば、ヒトプリオン病には大変有用である。本法が完成するためには、さらに有効なプローブを検索する必要がある。

E. 結論

現在日本で行われている BSE 検査に対応できるウエスタンブロット法及び免疫染色法の改良ができた。

実用に耐える国産のサンドイッチ ELISA キットが完成した。

ヒトプリオンの極く短時間で判定可能なバイオアッセイ系が完成した。動物プリオン病のバイオアッセイ系は完成していないため、早急に作製する必要がある。

抗プリオン蛋白抗体の実用的な mAb が複数えられ、さらにプリオンの構造を認識する mAb も得られた。

非侵襲的なプリオン・バイオイメージング法の開発のために検討したプローブはブラックタイプは成功したが、シナップスタイプの異常プリオンを検出できなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.
- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L-W. and Caughey, B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.*, 276: 15489-15497.
- Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)
- Tateishi J, Kitamoto T, Mohri S, Satoh S, Sato T, Shepherd A, Macnaughton MR. (2001) Scrapie removal using Planova virus removal

- filters. *Biologicals*. Mar;29(1):17-25.
- Yamashita M, Yamamoto T, Nishinaka K, Udaka F, Kameyama M, Kitamoto T. (2001) Severe brain atrophy in a case of thalamic variant of sporadic CJD with plaque-like PrP deposition. *Neuropathology*. Jun;21(2):138-43.
- Kawashima M., Suzuki S.O., Doh-ura K., Iwaki T. (2000) α -Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol.* 99:154-160.
- Kawashima T., Furuta A., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T. (2000) Ubiquitin-immunoreactive skein-like inclusions in the neostriatum are not restricted to amyotrophic lateral sclerosis, but are rather aging-related structures. *Acta Neuropathol.* 100:43-49.
- Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T. (2001) Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144.
- Kawashima T., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T. (2001) Cognitive dysfunction in patients with amyotrophic lateral sclerosis is associated with spherical or crescent-shaped ubiquitinated intraneuronal inclusions in the parahippocampal gyrus and amygdala, but not in the neostriatum. *Acta Neuropathol.* 102: 467-472.
- Suriki, H., Suzuk, K., Baba, Y., Hasegawa, K., Narisawa, R., Okada, Y., Mizuochi, T., Kawachi, H., Shimizu, F., and Asakura, H. (2000) Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by adoptive transfer of immunocompetent cells from infected with a murine retrovirus. *Clinical immunology*. 197: 33-42.
- Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., and Sawada, J. (2001) Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.* (in press)
- Kurosaki, A., Yusa, S., Nasu, Y., Nishimura, T., Nakamura, Y., Saeki, K., Natsumoto, Y., Itoharu, S., and Onodera, T. (2001.) Regulation of cellular form of the prion protein expression in mouse T lymphocyte development, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:103-107.
- Seeo, S-W., Hara K., Kurosaki, A., Nasu, Y., Nishimura, T., hayashida, N., Saeki, K., Matsumoto, Y., Endo, H., and

Onocdera, T.: (2001) Comparative analysis of the prion protein ORF nucleotide sequences from two wild ruminants, mouflon and golden takin Intervirology 44:359-363,

品川森一、堀内基広、松井高峯 (2001) プリオンの免疫学的検出法 生活衛生 45: 259-269.

池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 食品衛生研究 52: 33-42.

堀内基広 (2001) 動物のプリオン病 ウイルス 51: 145-150

水沢左衛子、岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子、青木陽一郎、斎賀菊江、小室勝利 (2001) 血漿分画製剤の安全性をめぐる最近の動向. Biomedical perspectives. 10: :227-232.

2. 学会発表

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴルの羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP合成ペプチドによるPrP分子相互作用の阻害 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊PrP遺伝子Tgマウスの羊スクレイピープリオンに対する感受性 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製PrP^{Sc}画分と特異的に反応するmAb 6H10の解析 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体パネルの作製 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋白質検出法の開発 第49回日本ウイルス学会学術集

会（大阪）2001年11月

毛利資郎、三好一郎、笠井憲雪、北本哲之：ヒト・プリオンのバイオアッセイ、第132回日本獣医学会学術集会ワークショップ（岩手県、盛岡市）7、2001年10月

堂浦克美：プリオン病の診断と治療—治療法開発の現状と早期診断法開発の重要性。第6回日本神経感染症研究会、2001年、札幌

堂浦克美：ヒトプリオン病の診断と治療—現状と将来への展望。第5回日本神経ウイルス研究会、2001年、大阪

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：マウスレトロウイルスを用いた異性間感染の解析。第49回日本ウイルス学会。2001年11月

大内史子、山河芳夫、西島正弘、神山恒夫：プリオンタンパク質のcompetitive assayによる定量 第74回日本生化学会大会（京都）2001年10月

絹見朋也、山河芳夫、萩原健一、金子清俊、西島正弘：遺伝性プリオン病M232R変異とプリオンタンパクの異常化 第74回日本生化学会大会（京都）2001年10月

井上雄嗣、大内文子、神山恒夫、岩崎拓也、小野寺節、西島正弘、山河芳夫：マウスプリオン病発症過程における脳、脾臓への異常プリオンタンパク質の蓄積 第74回日本生化学会大会（京都）2001年10月

G. 知的所有権の取得状況

I. 特許取得

発明者：北本哲之、三好一郎、毛利資郎

発明の名称：「プリオン病感染因子のスクリーニング方法」

出願日：平成13年1月31日

出願番号：特願20001-024279

発明者：堂浦克美、村上郁子

発明の名称：「病原性プリオンタンパク質生成阻害用組成物および病原性プリオン蛋白質生成阻害方法」

出願番号：特願2001-227093、

整理番号P0406T、2001年7月

発明者：藤森昭一、小野寺節、糸原重美

発明の名称：プリオンタンパク質に対するモノクローナル抗体

発明者：糸原重美、小野寺節、藤森昭一

発明の名称：プリオン遺伝子を有しないマウスミエロマ細胞株

II 分担研究報告書

免疫磁性ビーズを用いた PrP^{Sc} 検出法の開発

主任研究者 品川 森一 帯広畜産大学獣医公衆衛生学教授

研究要旨

組替えプリオン蛋白 (rPrP) 及びマウス PrP^{Sc} を抗原として作成したモノクローナル抗体(mAb) 34 個の性状解析と抗原抗体反応の可能な PrP^{Sc} の変性剤 GdnSCN 濃度を captured ELISA により検討し、免疫磁性ビーズ法を開発した。mAb 44B1 が最適 capture 抗体であった。mAb 72-5 の Fab をビオチン標識して、検出抗体としたビーズ上の ELISA も可能であった。captured ELISA 及びウエスタンブロット法に比べてバックグラウンドが高いため、検出感度が低いことが判った。得られた mAb の中に未変性の PrP^{Sc} を特異的に認識するものが含まれていた。

A. 研究目的

現在実用化されているプリオン病の診断法は蛋白分解酵素により PrP^C を消化除去し、残存する PrP^{Sc} を変性剤処理して抗 PrP 抗体によって検出するものである。これらの診断法の感度を上げるためには PrP^{Sc} を濃縮する過程が必要不可欠である。遠心操作は PrP^{Sc} の濃縮に有効であるが多検体処理が必要な場合には適さない。そこで、抗原の選択的な濃縮が可能である免疫磁性ビーズを用いた PrP^{Sc} の濃縮法について検討した。また、免疫磁性ビーズ法を含めて、感度向上にはより優れた抗体が必須であり、優れた抗体の作成と選択を継続的に実施した。

B. 研究方法

mAb の作成のため、大腸菌で発現させた組換えマウス PrP(rMoPrP23-231)およびスクレイビー感染マウス脳から精製した MoPrP^{Sc} を PrP 遺伝子欠損マウスに免疫して常法に従い細胞融合を行い、ハイブリドーマの上清を rMoPrP23-231 および MoPrP^{Sc} でスクリーニングを行なってハイブリドーマを樹立した。

得られた mAb の性状解析および標識は以下の通りである。mAb が認識す

るエピトープは、各種欠損 rMoPrP および Pepspot 膜を用いて解析した。種間交差反応性は、各種 rPrP および PrP^{Sc} を用いて解析した。免疫沈降反応には主としてスクレイビー Obihiro 株感染マウス脳脳乳剤あるいは精製 PrP^{Sc} を用いた。多量の mAb を必要とする際は、ハイブリドーマを無血清培地で高密度培養し、培養上清から mAb を塩析後、ゲル濾過して調整した。ビオチン標識 mAb Fab フラグメントの調整のため、mAb をペプシン処理後に 2-メルカプトエタノールアミンで還元し、BMCC-biotin によりビオチン化した。磁性ビーズ作製のため、昨年開発した Captured ELISA を用いて 8 種類の mAb の中から Capture 抗体あるいは検出抗体として最適な組み合わせを検討し、DYNAL 社のプロテイン G 結合磁性ビーズに結合させた。

(倫理面絵の配慮)

実験動物使用時は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施している。また、使用動物数は必要最小限に止めている。

C. 研究結果

組替え PrP の免疫により 18 種、未変性マウス PrP^{Sc} 免疫により 15 種の mAb が得られた。これらは認識エピトープの違う 8 群と高次構造を認識する 1 つの合計 9 群に分けられた。認識エピトープおよび反応性から 8 mAb を選び、capture 抗体あるいは検出抗体として最適な組み合わせを captured ELISA にて検討した (表 1)。capture 抗体として 31C6 及び 44B1 が適当であった。PrP^{Sc} が免疫磁性ビーズと反応するためには 2.6M 以上の GdnSCN で変性・分散させ、0.42M 以下に希釈する必要がある。しかし GdnSCN の存在下の反応性は 44B1 が優れているため、こちらを選らんで免疫磁性ビーズを作製した。検出用抗体として 31C6 及び 72-5 が適当であることが判ったため、ビオチン化 Fab として検出に用いた。この検出用抗体を用いて、免疫磁性ビーズ上で ELISA を行って PrP^{Sc} の検出を行った。PrP^{Sc} との反応性は十分であったがバックグラウンドである正常脳の陰性対照及び陰性 capture 抗体の価も比較的高かった (表 2)。

ウエスタンブロット及び captured ELISA との検出感度を比較するため、スクレイビー感染脳乳剤を正常脳乳剤で希釈して試料調整を行った。磁性ビーズを用いた ELISA 法では 2⁷ まで陽性であったのに比べ、ウエスタンブロット法では 2⁸ まで、試料をそのまま captured ELISA に用いた場合 2⁹、遠心濃縮を組み合わせた場合 2¹⁴ 希釈まで陽性であった。

PrP^{Sc} の高次構造を認識する抗体は PrP^C とは反応せず、PrP^{Sc} の構造をグアニジン塩濃度を高めて構造を破壊するにしたがって反応性が低下した。

D. 考察

多数の mAb が得られたが、PrP^{Sc} 検出に使用できる抗体の数は多くなかった。しかし、エピトープの違いを考慮して 8 種の抗体を用い組み合わせを検討することができ、今回使用した 44B1 は capture 抗体としてだけでなく、ウエスタンブロットでも高い検出能を持っていた。

磁性ビーズを用いた ELISA 法は比較的大容量の試料から遠心をせずに抗原を補足・濃縮することができるため、

自動化が可能な簡便な方法と言える。今回開発した方法は、多分わずかであるが検出用抗体の非特異的な吸着が起きるため、バックグラウンドが高くなり、その結果感度低下を来したと考えられる。磁性ビーズの材質を換えることによりバックグラウンドを低下させることが可能であろう。

構造を認識する抗体はこれまで 1 例が報告されているが、その詳細は判っていない。我々の抗体は PrP^{Sc} の変性に伴い反応性を失うため、構造を認識する抗体の第 2 例目と言える。本抗体を用いることにより従来と発想の違う検出系が開発可能となった。また、PrP^{Sc} 複製の解析などにも応用が可能と考えられる。

E. 結論

1. 組替え PrP 及び未変性マウス PrP^{Sc} を抗原として得られた 34mAb を反応性、エピトープ等から 9 群に分類できた。
2. Capture 能及び検出感度の高い mAb の組み合わせを選び、免疫磁性ビーズを作製し、これを用いた ELISA 系が構築されたが、感度は十分ではなかった。
3. 未変性 PrP^{Sc} (プリオン) を特異的に認識する抗体が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)

品川森一、堀内基広、松井高峯 (2001) プリオンの免疫学的検出法 *生活衛生* 45 巻 259-269.

池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 *食品衛生研究* 52 巻 33-42.

2. 学会発表

- ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴルの羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型 第 131 回日本獣医学会学術集会（東京）2001 年 4 月
- 堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP 合成ペプチドによる PrP 分子相互作用の阻害 第 131 回日本獣医学会学術集会（東京）2001 年 4 月
- 山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化 第 131 回日本獣医学会学術集会（東京）2001 年 4 月
- ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊 PrP 遺伝子 Tg マウスの羊スクレイビープリオンに対する感受性 第 49 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001 年 11 月
- 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製 PrP^{Sc} 画分と特異的に反応する mAb 6H10 の解析 第 49 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001 年 11 月
- 金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体パネルの作製 第 49 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001 年 11 月
- 毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋白質検出法の開発 第 49 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001 年 11 月

表1. 抗体の組み合わせの検討

		検出抗体 (ビオチン化 Fab')							
		39-2	72-5	110-2	43C5	44B1	44B2	31C6	B-103
Capture 抗体	39-2	■	±	±	±	±	±	±	-
	72-5	+	■	NS	±	NS	-	-	++
	110-2	-	++	■	-	+	+	+	NS
	43C5	±	-	+	■	+	-	++	±
	44B1	±	++	NS	-	■	++	++	++
	44B2	±	-	-	-	++	■	-	+
	31C6	+	±	++	±	++	+	■	+
	B-103	±	+	NS	-	++	+	+	■

++:高度, +:中程度 ±:低度, -:反応せず, NS:非特異反応

B-103:抗 PrP ペプチド ウサギ抗体

表2. 免疫磁性ビーズ ELISA

使用 mAb		試料	OD 450nm
Capture 用	検出用		
44B1	31C6	感染脳	0.758
//	//	非感染脳	0.182
陰性抗体	//	感染脳	0.191

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

BSE サーベイランス確定検査用迅速ウエスタンブロット法の改良

分担研究者 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 助教授

研究要旨

BSE スクリーニングでは、各食肉検査事務所で ELISA による一次スクリーニングで陽性もしくは疑陽性と判定された検体はウエスタンブロットおよび病理組織学的検査による確定検査を行う。確定検査では迅速かつ精度の高い検査が要求される。そこで、我々は当研究室で確立したウエスタンブロットによる PrP^{Sc} の検出法を基に、簡便化および迅速化を目的とした改良を行った。改良により免疫染色まで含めて、最短 6 時間で全行程が実施可能になった。抗 PrP 抗体を比較した結果、mAb44B1 = mAbT2 > B103 = mAb6H4 = mAb43C5 であった。一次スクリーニングの ELISA と確定検査のウエスタンブロットの感度を BSE 牛延髄試料を非感染牛脳試料にスパイクして比較したところ、検出用抗体として B103 を使用した場合でもウエスタンブロットのほうが 4 倍以上感度が高かった。

A. 研究目的

BSE スクリーニング検査一次検査同様、確定検査においても迅速性が要求される。同時に一次検査以前の感度と精度も要求される。そこで、我々が開発した PrP^{Sc} 調製法(J. Virol. Methods, 64: 205-216, 1997)を基本に、確定検査に使用するウエスタンブロット(WB)法の簡略化および高感度化を目的とした改良を試みた。同時に、全国の確定検査実施機関で同等の精度で検査を実施するために WB 法のプロトコル化を試みた。

B. 研究方法

BSE 牛から PrP^{BSE} 粗画分の調製法を短縮化するために、我々が確立した方法(J. Virol. Methods, 64: 205-216, 1997)の各々のステップ（コラゲナーゼ処理、Proteinase K 処理、遠心処理）に要する時間および処理条件をを検討した。試料調製後の WB 法に要する時間の短縮化を目的として、SDS-PAGE の泳動条件、PVDF 膜への転写条件、免疫染色の条件を検討した。より検出感度の高いモノクローナル抗体(mAb)を選定す

るために、PrP^{BSE} を段階希釈して WB を行い、アフィニティーの高い mAb の選抜を行った。最終的な感度の比較は、PrP^{BSE} の含量が少ない試料を模倣するために、非感染牛の脳乳剤に BSE 感染牛の脳乳剤をスパイクした試料を作製し、そこから PrP^{BSE} の検出を行った。

C. 研究結果

ポリクローナル B103 を含め、7 種の抗体（表 1）の PrP^{BSE} 検出感度を比較した結果、mAb44B1 = mAbT2 > B103 = mAb43C5 = mAb72-5 = mAb6H4 > mAbT1 であった（図 1）。mAb44B1 と mAbT2 はバックグラウンドが高くなる傾向にあった。mAb43C5 はバックグラウンドが非常に低いという特徴を有していた。

試料調製法は最終的に表 2 に示す方法を採用した。この方法は、乳剤作製にマルチピースショッカーを使用し、コラゲナーゼ処理 30 分、PK 処理 30 分、遠心操作により PrP^{BSE} を回収する際に 2-Butanol-Methanol を加え、脂質除去を行う工程からなる。試料が数検

体であれば、試料採取から約2時間以内に試料調製が終了する。また、従来6~15時間を要していたPVDF膜への転写を、高電圧下で行うことで、感度を損なうことなく1~2時間まで短縮可能であった。

抗原抗体反応によるPrP^{BSE}の検出は、通常の間接法を用いた場合4時間を要するが、HRP標識Fab fragmentを用いた直接法を採用することでブロッキングから結果を得るまでの時間を2時間半に短縮できた。

スパイク試料を用いて、表2に示したプロトコールに従ったWBと一次検査で使用しているELISAのPrP^{BSE}検出感度を比較したところ、少なくともWBは4倍以上感度が高かった(図2, 3)。

D. 考察

B103は免疫原として用いた合成ペプチドでアフィニティー精製した純度の高い抗体を用いているが、ポリクローナル抗体の問題点としてロット間の性能の違いが懸念されるため、将来的にはmAbに置き換えたほうが良い。今回、B103の反応性と少なくとも同等、あるいはそれを凌駕するmAbが複数得られたことから、今後mAbに置き換えることが可能となった。候補としては感度の高いmAb44B1, mAbT2、バックグラウンドの低いmAb43C5が挙げられる。このうちmAb44B1とmAb43C5は認識するエピトープが判明しており、大量供給の準備が調っている。また、HRP標識Fabフラグメントを使用する直接法では、mAb72-5が良好な結果を示した。HRP標識Fabフラグメントはまだ供給の準備が調っていないが、免疫染色の短縮化が可能なることから、供給にむけての準備を始める予定である。

E. 結論

BSEスクリーニング検査の確定検査に使用するためのWB法のプロトコールを確立した。本法に従うと、6~8時間で検査が終了する。また、一次検査で使用しているELISAよりも感度が高いことから、確定検査法として十分機能すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L-W. and Caughey, B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.*, 276: 15489-15497.

Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)

品川森一、堀内基広、松井高峯 (2001) プリオンの免疫学的検出法 生活衛生 45巻 259-269.

堀内基広 (2001) 動物のプリオン病 ウイルス 51巻 145-150.

池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 食品衛生研究 52巻 33-42.

2. 学会発表

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴルの羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型 第131回日本獣医学会学術集会(東京) 2001年4月

堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP合成ペプチドによるPrP分子相互作用の阻害 第131回日本獣医学会学術集会(東京) 2001年4月

山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化 第131回日本獣医学会学術集会(東京) 2001年4月

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊PrP遺伝子Tgマウスの羊スクレイビープリオンに対する感受性 第49回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2001年11月

狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製PrP^{Sc}画分

と特異的に反応する mAb 6H10 の解
析 第 49 回日本ウイルス学会学術
集会（大阪）2001 年 11 月

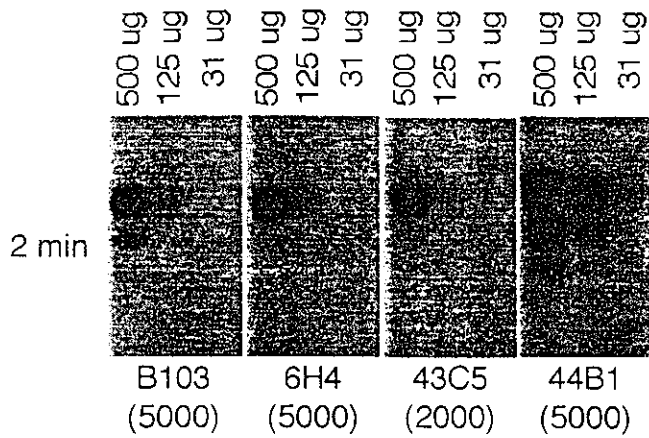
金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀
内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷
淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン
蛋白に対するモノクローナル抗体パ
ネルの作製 第 49 回日本ウイルス
学会学術集会（大阪）2001 年 11 月
毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森
一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：
免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋
白質検出法の開発 第 49 回日本ウ
イルス学会学術集会（大阪）2001 年
11 月

表1 使用抗体

抗体	免疫原	免疫動物	エピトープ	作製場所
B103	BoPrP 103-121	Rabbit	BoPrP 103-121	帯広畜産大
mAb 6H4	rBoPrP	PrP ^{0/0} mouse	BoPrP 155-163	Prionics
mAb T1	rMoPrP 121-231	PrP ^{0/0} mouse	MoPrP135-140	動物衛生研究所
mAb T2	rMoPrP 121-231	PrP ^{0/0} mouse	ND	動物衛生研究所
mAb 44B1	rMoPrP 23-231	PrP ^{0/0} mouse	MoPrP155-231	帯広畜産大
mAb 43C5	rMoPrP 23-231	PrP ^{0/0} mouse	MoPrP161-169	帯広畜産大
mAb 72-5	MoPrP ^{Sc}	PrP ^{0/0} mouse	MoPrP 143-153	帯広畜産大

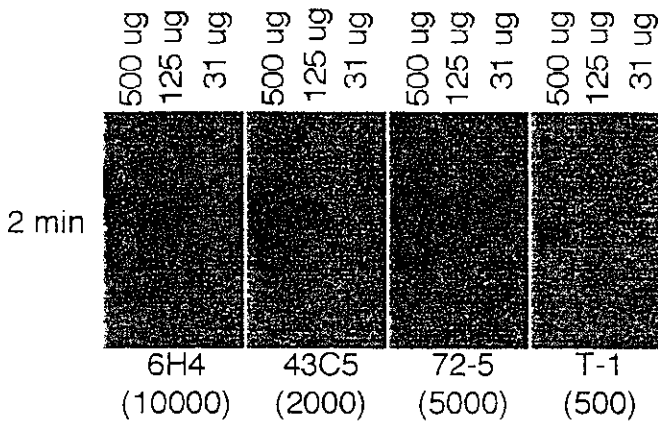
表2 確定検査用ウエスタンブロット法

項目	操作など	時間	積算時間
脳乳剤調製	マルチビーズショッカー, 2000 rpm, 15 sec	20 min	
前処理	Collagenase, 0.5 mg/100mg tissue 37°C	30 min	50 min
PK 処理	Proteinase K, 40ug/100 mg tissue, 37°C	30 min	80 min
PK 不活化	2 mM Pefabloc	5 min	
脂質除去	2-butanol : methanol = 5 : 1	5 min	90 min
PrP ^{BSE} 回収	15000 rpm	10 min	
WB 用	SDS-Urea sample buffer	20 min	120 min
SDS-PAGE	Invitorgen, NuPAGE 12% Bis-Tris gel, 200V	60 min	180 min
転写	Wet blotting, 80V	60 min	240 min
ブロッキング	5% skim milk - (5% FBS) in PBST	60 min	300 min
標識抗体	HRP-mAb 72-5	60 min	360 min
化学発光	ECL	30 min	390 min



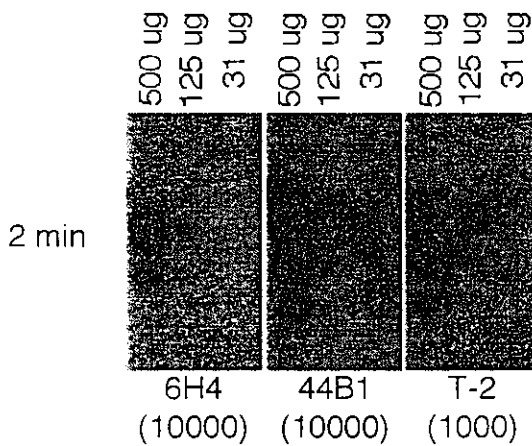
Exp. 1. sample: BSE#4-10-Sar

B103 = 6H4 = 43C5 < 44B1



Exp. 2. sample: BSE#4-10

T-1 < (B103) = 6H4 = 43C5 = 72-5



Exp. 3. sample: BSE#4-10

(B103) = 6H4 < 44B1 = T-2

図1. 抗PrP抗体のPrP^{BSE}検出感度。BSE牛の脳から試料を調整し、500, 125, 31 ug 組織当量を電気泳動し、WB後、図中に示した抗体(カッコ内は希釈倍率)でPrP^{BSE}を検出した。写真左はX線フィルムへの露光時間。Exp.1~4はそれぞれ独立した実験。

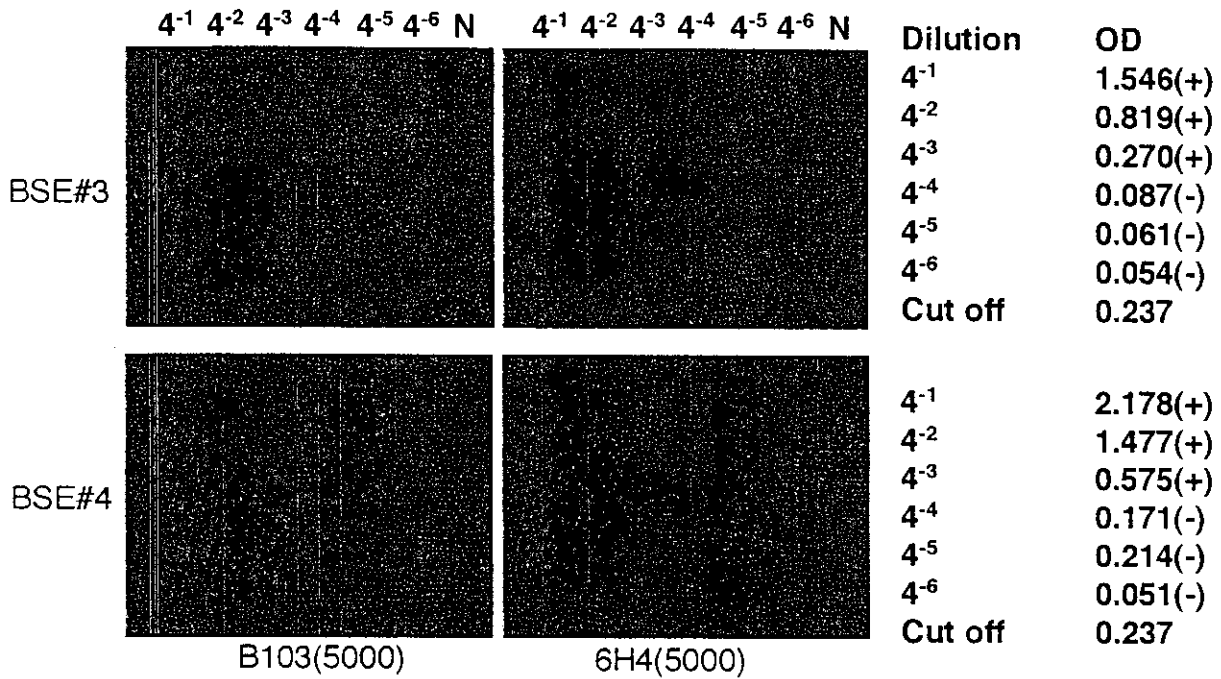


図2. スパイクテスト。BSE#3およびBSE#4の20%脳乳剤をBSE非感染牛の20%脳乳剤で4倍改段階希釈した乳剤からWB用試料を調整した。各レーン10mg組織当量を泳動。B103と6H4で染色した(カッコ内は希釈倍率)。NはBSE非感染牛のサンプル(陰性対照)。30分間露光した。6H4, B103ともに4⁻⁴希釈(256倍)まで陽性であった。

同じ希釈列を用いて行ったBio-RadELISAの結果を写真右に示した。BSE#3およびBSE#4ともに4⁻³希釈(64倍)まで陽性であった。

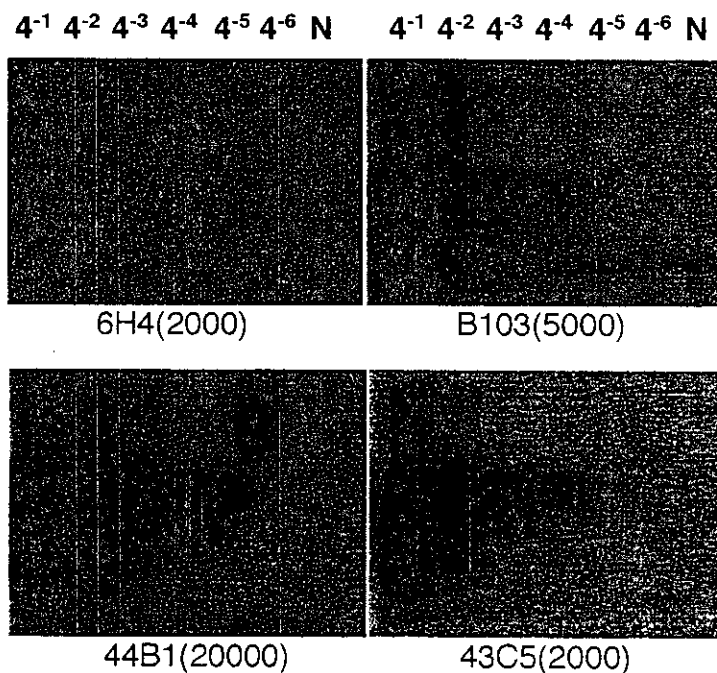


図3. スパイクテスト。BSE#2の20%脳乳剤をBSE非感染牛の20%脳乳剤で4倍改段階希釈した乳剤からWB用試料を調整した。各レーン10mg組織当量を泳動。染色に使用した抗体(カッコ内は希釈倍率)はパネルの下に示した。NはBSE非感染牛のサンプル(陰性対照)。30分間露光した。

6H4, B103, 44B1は4⁻⁵希釈(1024倍)まで陽性。

CJD 脳における正常型プリオン蛋白と異常型プリオン蛋白に関する研究

分担研究者 北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野 教授

研究要旨

プリオン蛋白には、界面活性剤の存在下で不溶性となる異常型プリオン蛋白と可溶性である正常型プリオン蛋白が存在する。正常型と異常型の違いはまた、蛋白分解酵素による抵抗性においても認められる。しかしながら、CJD を発病した症例の剖検脳において正常型プリオン蛋白はどのくらい存在するのか、異常型はどのくらいなのかを示した研究は小数である。この研究では、サルコシルやトライトンなどの界面活性剤存在下での、正常プリオン蛋白と異常プリオン蛋白の比較を行った。この正常型プリオン蛋白の検出に利用したのがポアサイズ 75nm と 35nm のフィルターを用いたろ過実験である。正常コントロールとしてアルツハイマー病の脳を用いて、CJD の脳と比較すると、予想外に CJD の脳ではろ過可能な正常型プリオン蛋白が少量しか存在しないことが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病の脳内には、異常プリオン蛋白と正常プリオン蛋白が存在すると思われている。これは、漠然とそのように考えられているというのが現状である。正確な意味では、正常プリオン蛋白と異常プリオン蛋白の構造を特異的に判別する抗体がなければ、正常プリオン蛋白の存在は証明されたわけではない。便宜的に、Proteinase 抵抗性のプリオン蛋白の量と全プリオン蛋白の量を比較して、正常プリオン蛋白が存在していると予想しているに過ぎない。今回我々は、正常型プリオン蛋白がどの程度存在するのかをろ過実験を行うことによって推定した。

B. 研究方法

1) ヒト・プリオン病の代表として、

孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病（コドン 129Met/Met, 変異なし、異常プリオン蛋白タイプ 1）と Alzheimer 病の剖検脳を用いた。

- 2) 5%脳乳剤（1%TritonX100 または 1%Sarkosyl 存在下）をポアサイズ 75nm または 35nm の膜を用いてろ過実験を行った。
- 3) ろ過前後で、異常プリオン蛋白、正常プリオン蛋白を Western Blot 法で検出した。異常プリオン蛋白の検出はろ過液 1 ml を用いて、Protease 抵抗性分画を用いて行った。

C. 研究結果

- 1) CJD のろ過液で、Western blot を行ったところ、異常プリオン蛋白が検出されるのは 75nm のろ過液のみであり、

35nm のろ過液では異常プリオン蛋白は検出限界以下であった。また、脳乳剤の塩濃度を上げることと脳乳剤に水溶性有機溶剤を加えることによって75nm のろ過液でも異常プリオン蛋白は検出限界以下に低下した。このことは、ろ過液中に回収される異常プリオン蛋白はごく一部であり、そのほとんどは75nm のポアサイズで除外されてしまうほど大きな凝集塊を作っていることを示すとともに、感染性分画が界面活性剤存在下では35nm を通過するのに、35nm のろ過液では異常プリオン蛋白が検出されないという免疫学的アッセイ法の限界を端的に表している。ただ、感染性分画としてチェックしたのは、CJD マウス株での感染性に関するのみであり、今後ヒト・プリオンを用いたろ過実験の検索結果の後に、感染実験によるバイオアッセイ法と免疫アッセイ法の感度比較が可能となるので、結論を出すにはいまだ時期尚早である。

- 2) ろ過後の正常プリオン蛋白を CJD と Alzheimer 病で比較すると、CJD では極少量のプリオン蛋白しかろ過されてこないことが明らかとなった。CJD では、プリオン蛋白の総量は Alzheimer に比較して多い傾向にあるが、そのほとんどはろ過操作によって除かれる異常型プリオン蛋白であることが明らかとなった。

D. 考察

従来我々が想像していたことは、CJD では正常型プリオン蛋白と異常型プリオン蛋白がほぼ同程度存在し、臨床経過にともなっ

て異常型プリオン蛋白は徐々に増加し、正常プリオン蛋白は軽度低下が見られるのではないかという現象であった。しかしながら、得られた結果は、同じように神経細胞が減少する Alzheimer 病と比較しても、CJD ではろ過可能な正常型プリオン蛋白は極端に減少しているという事実であった。今年度明らかとなった正常プリオン蛋白と異常プリオン蛋白の量的な関係を孤発性 CJD のコドン129 Met/Met タイプだけでなく、ヒトのプリオン病に広く応用して検討する予定である。プリオン病を発病した動物などの脳に本当に正常型と呼べるプリオン蛋白がどのくらい存在するのかが興味ある点である。

E. 研究発表

1.論文発表

1: Tateishi J, Kitamoto T, Mohri S, Satoh S, Sato T, Shepherd A, Macnaughton MR. Scrapie removal using Planova virus removal filters. *Biologicals*. 2001 Mar;29(1):17-25.

2: Yamashita M, Yamamoto T, Nishinaka K, Udaka F, Kameyama M, Kitamoto T. Severe brain atrophy in a case of thalamic variant of sporadic CJD with plaque-like PrP deposition. *Neuropathology*. 2001 Jun;21(2):138-43.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

発明の名称「プリオン病感染因子のスクリ

ーニング方法」

発明者：北本哲之 ほか2名