

由として（１）専門医による情報収集、（２）サーベイランス委員会による症例ごとの検討、の２点を挙げることができる。

今回の検討例でプリオン蛋白遺伝子の異常を認めた症例が結果が判明している CJD 患者 110 人中 11 例（10%）存在した。しかしながら、プリオン蛋白遺伝子の検索を行っていない例も多く、実際に遺伝子異常を持つ症例の割合はこれよりも高いものと思われる。委員会では遺伝子異常の検索を積極的に勧めており、今後、実体が明らかになってくるものと思われる。

図 3 に示す臨床像は、一般的に考えられているクロイツフェルト・ヤコブ病の臨床像と比較して、特に変わったものではない。特に表 1 に示す発病から主要症状出現までの期間の分布では、いずれの症状も極めて短期間に多くの症例で出現していることを示している。

本サーベイランスで硬膜移植例は新たに 16 例が明らかになった。いずれも 1987 年あるいはそれ以前に硬膜移植を受けており、1986 年の処理方法変更以前のものと思われる。このために移植から発病までの期間は延長傾向にある。今後とも硬膜移植歴のあるものからクロイツフェルト・ヤコブ病が発症することは充分考えられる⁹⁾ ことが本研究の結果からも指示されたため、詳細な情報収集と観察が必要である。

〔参考文献〕

- 1) Nakamura Y, Yanagawa H, Hoshi K, et al.: Incidence rate of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *Int J Epidemiol.* 28:130-134, 1999
- 2) 厚生省保健医療局疾病対策課監修：クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル。新企画出版社，東京：27-30, 1997
- 3) 中村好一，北本哲之，佐藤猛，他：クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス結果。厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班平成 11 年度研究報告：55-65, 2000
- 4) 中村好一，玉腰暁子，稲葉裕：臨床個人調査票による患者実態調査とその体系的利用に関する試案。厚生省厚生科学研究特定疾患対策研究事業特定疾患の疫学に関する研究班平成 11 年度研究業績集：19-25, 2000
- 5) 中村好一，佐藤猛，志賀裕正，他：特定疾患治療研究事業による臨床調査個人票をもとにしたクロイツフェルト・ヤコブ病の疫学像とこれをもとにしたサーベイランス結果。厚生労働省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班平成 12 年度研究報告書：61-72, 2001.
- 6) Nakamura Y, Aso E, Yanagawa H: Relative risk of Creutzfeldt-Jakob disease with cadaveric dura transplantation in Japan. *Neurology.* 53:218-220, 1999
- 7) Nakamura Y, Oki I, Tanihara S, et al.: A case-control study of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: transplantation of cadaveric dura mater was a risk factor. *J Epidemiol*; in press
- 8) Masters CL, Harris JO, Gajdusek C, et al.: Creutzfeldt-Jakob disease: Patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol.* 5:177-88, 1979
- 9) 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.* 125:201-205, 2000

〔研究発表〕

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

〔知的所有権の取得状況〕

該当なし

表1. 初発から主要症状出現までの期間の分布（月）

	平均	標準偏差	中央値	最小値	最大値	n
ミオクローヌス	3.2	3.8	2	0	27	206
痴呆または意識障害	1.9	4.8	1	0	48	222
錐体路症状	4.4	7.9	2	0	48	164
錐体外路症状	4.1	7.4	2	0	48	160
小脳症状	1.9	4.8	1	0	48	123
視覚異常	1.1	1.7	0	0	7	86
精神症状	1.9	5.0	0	0	44	127
無動・無言状態	4.5	6.3	3	0	72	201

症状が出現し、期間が判明している者のみ集計

表2. 硬膜移植年と発病までの期間（年）

厚生労働省研究班把握例81例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	合計
1979													1			1		1	3
1980														1					1
1981									1	1			1						3
1982							1	1			1		1		1				5
1983		1	1						1	1			1	4	1				10
1984	1	4					1	3			2		3	1					15
1985		1		2	2			3	2	1	1		2	1					15
1986		1		1	1	1	1	1	3		1	2	2						14
1987	1	1				1	3	1	2		2		1						12
1988									1										1
1989							1												1
1990																			
1991		1																	1
合計	2	9	1	3	3	2	7	9	10	3	7	2	12	7	2	1		1	81

厚生労働省遅発ウイルス感染調査研究班

図1. 年齢階級別患者数
厚生労働省研究費サーベイランス登録227例

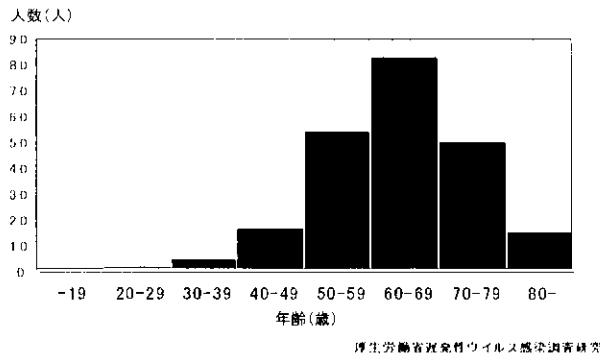


図2. 発病年別患者数
厚生労働省研究費サーベイランス登録227例

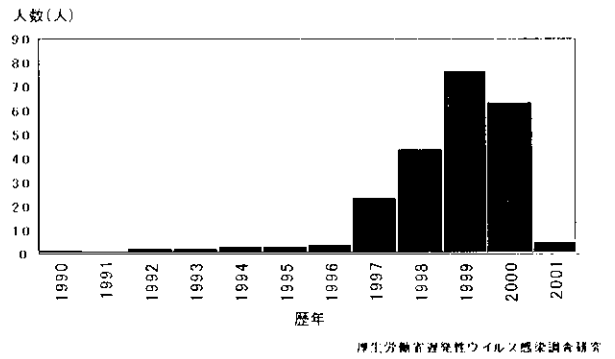


図3. 主要症状の有無
厚生労働省研究費サーベイランス登録227例

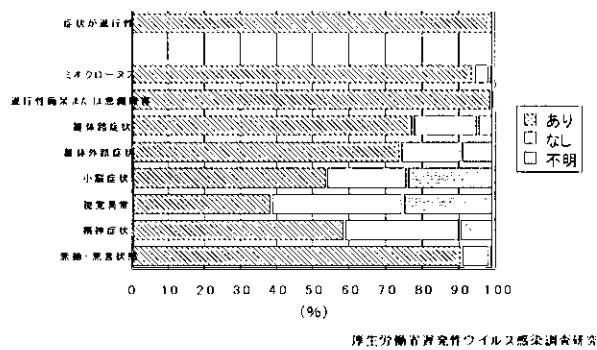


図4. 検査所見の出現頻度
厚生労働省研究費サーベイランス登録227例

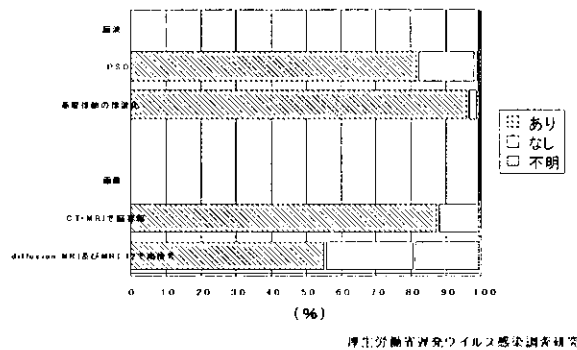


図5. 脳性髄液検査結果
厚生労働省研究費サーベイランス登録227例

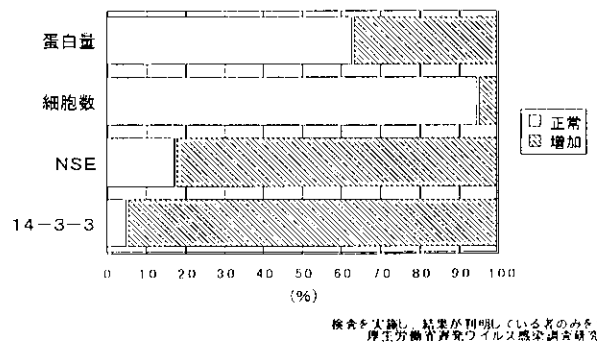


図6. 他疾患との鑑別状況
厚生労働省研究費サーベイランス登録227例

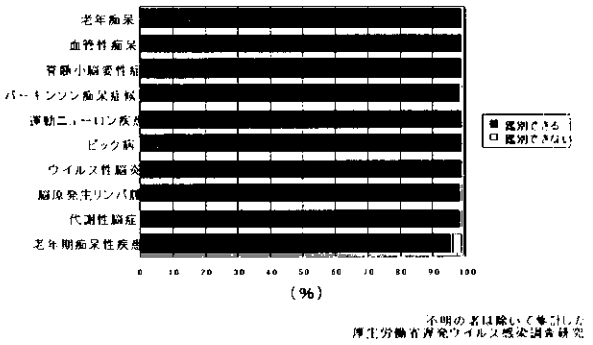
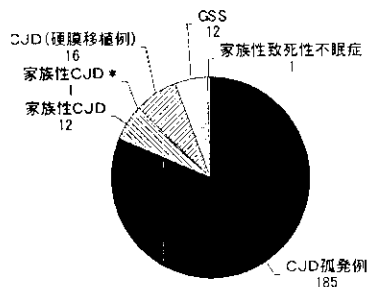
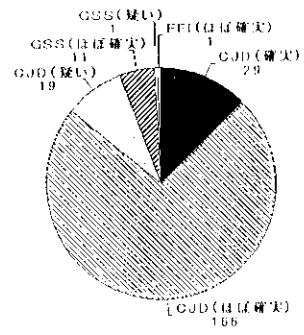


図7. 診断(疾患分類)
厚生労働省研究開発データベース登録227例



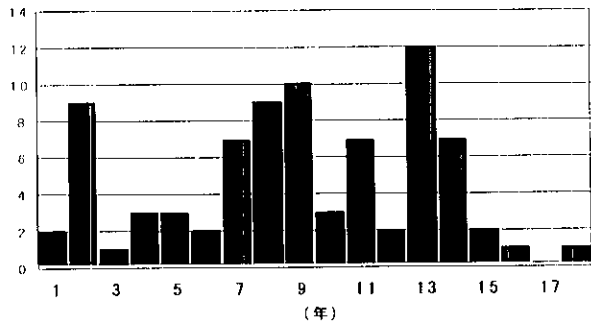
*: 家族性CJDだが、プリオン蛋白質遺伝子の異常を認めず
厚生労働省研究開発データベース登録227例

図8. 病名と診断の確実度
厚生労働省研究開発データベース登録227例



厚生労働省研究開発データベース登録227例

図9. 硬膜移植からCJD発病までの期間の分布(年)
厚生労働省研究開発データベース登録11例



厚生労働省研究開発データベース登録11例

可溶性プリオン蛋白検出の試み

班 員：田中 智之（堺市衛生研究所）
研究協力者：北元 憲利（姫路工業大学・環境人間学部）
研究協力者：村本 環（東北大学大学院医学系研究科・病態神経学分野）
班 員：毛利 資郎（九州大学大学院医学系研究科・実験動物学講座）
班 員：北本 哲之（東北大学大学院医学系研究科・病態神経学分野）

【研究要旨】

作製された可溶性プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体を用いてサンドイッチELISA法で可溶性プリオン蛋白の検出を試みた。大腸菌に発現された可溶性プリオン蛋白の検出感度は50ngであった。99例の中樞神経系疾患患者の内CJDおよびCJD疑いでは約30%に臨床診断と高いELISA値の一致が見られた。これは諸外国の測定感度に比べ三分の一であった。

今後、この測定系に反応する蛋白の性状を含め、感度の向上がさらなる課題として残された。

Detection of soluble human prion protein from human plasma with neurological diseases.

Tomoyuki TANAKA¹⁾, Noritoshi KITAMOTO²⁾, Tamaki MURAMOTO³⁾, Shiro MOHRI⁴⁾
and Tetsuyuki KITAMOTO³⁾

1) Sakai-city Institute of Public Health

2) Humanities for Environmental Policy and Technology, Himeji Institute of Technology

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

4) Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Kyushu University

ABSTRACT

Monoclonal antibodies which were produced to prion pretein (PrP) were constructed to detect PrP in the human plasma. The detection limit in *E.coli* vector expressed PrP was 1 to 0.5 ng / 50 μ l by PrP detection ELISA system. Among ninety-nine patients with neurological diseases 45 cases were clinically suspected as CJD. In these patients 13 cases (29%) were higher level of OD titers by ELISA assay system.

The sensitivity is not high enough, however, more improvement of this assay system might be useful as a surrogate marker for *in vitro* diagnostic system of neurological diseases including CJD.

【はじめに】

プリオン病は異常プリオン蛋白の異常蓄積による。これらの異常プリオン蛋白は、プリオン蛋白ダイマー説をはじめとしていくつかの仮説のもと、増加・蓄積するものと考えられている。プリオン蛋白は神経細胞への正常機能維持のために産生、あるいは体外より摂取された場合においても、体液中に可溶性プリオン蛋白として存在すると考えられている。しかし、その性状や濃度、さらにその検出系の構築はプリオン蛋白の役割を究明する上で意義深い。前年度は大腸菌にて発現した可溶性プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体を作製し、その性状について報告した。一部、*in vitro*での可溶性プリオン蛋白検出系の確立について検討した。

今回、検出系構築の検討と併せて臨床検体を用いて *in vitro*での可溶性プリオン蛋白の検出を試みた。

[材料と方法]

- 1) 可溶性プリオン蛋白 (sPrP) 検出系にはサンドイッチ ELISA 法を構築した。
- 2) 固相抗体としてアミロイド斑から抽出したプリオン蛋白に対するウサギ抗体 APC を用いた(北本班長より分与)。検出抗体には前年度と同じ MAbs を用いたが特に #4 に焦点を合わせ一部 s#2065 も用いた。測定方法は前報とほぼ同様である。
すなわち、ELISA plate に希釈 APC 抗体を固相した。PrP 検出対象にはヒト血漿および血液、大腸菌発現による sPrP、培養細胞から遊離させたヒトプリオン蛋白(Hu-PrP)を用いた。これらを 37°C、2時間反応した。洗浄後希釈 MAbs を同様に 37°C、2時間反応し洗浄した。その後 HRPO 標識抗マウス IgG 抗体を用い H₂O₂ 下で ABTS にて呈色した。
- 3) 培養細胞からの Hu-PrP の遊離は以下のようにして行った。ヒトプリオン蛋白遺伝子を組み込んだプラスミド発現ベクター(または発現ベクター単独)を COS7 細胞にリポフェクションを用いて取り込ませた。48 時間後にメディアウムを、PIPLC を含むリン酸バッファー (PBS) と置換したのち 3 時間室温でインキュベートすることにより、プリオン蛋白を含む GPI アンカー型膜蛋白を PBS 中へ遊離させた。回収した PBS から低速遠心およびフィルター濾過により細胞成分を除去したものを Hu-PrP(または Vector) サンプルとして用いた(図 1、4)。
- 4) 中枢神経系疾患患者 99 例から得られた血漿を 100 倍希釈して ELISA 測定を行った。その内訳は臨床的に CJD と診断された 27 症例、疑 CJD 症例 18 例、CJD でない中枢神経系疾患 30 例、不明例 11 例、GSS 症例 5 例、コドン 180 および 105 変異家族性 CJD 各 1 例、疑 Val 変異 CJD 6 例である。
- 5) 正常人血清 18 例を用いた。男女比 1:1、年齢は 20 歳から 59 歳まで(平均年齢 43)である。
- 6) モノクローナル抗体はマウス腹腔内にて腹水として作製された。腹水採取後マウスはクロロホルム麻酔後安楽死し、倫理面への配慮をした。

[結果]

- 1) 構築された ELISA 法による大腸菌にて発現 sPrP は 50ng で検出された。一方、培養細胞より精製された Hu-PrP は 100ng 相当の感度で検出された(図 1)。
- 2) 前回報告の s#2065 抗体は大腸菌発現の sPrP のみならず、培養細胞より精製された Hu-PrP にも反応した。しかし、その他の抗体の反応性は低かった。
- 3) 臨床的な中枢神経系疾患患者 99 例の測定結果は表 1 に示した。すなわち臨床的に CJD と認められた 27 例中 7 検体、CJD と疑わしき症例 18 検体中 6 検体、CJD でない 30 症例中 2 検体、GSS 症例 5 例中 1 例、Val 変異が疑われる CJD 疑い 6 症例中 1 例、家族性 CJD 疑いの症例 2 例では 0、臨床的に神経疾患でないと思われる 11 症例中 1 検体が高い OD 値を示した。図 2 に各々の疾患全例の平均 OD 値を示す。
- 4) 正常人 18 例では、1 例に軽度の OD 値の上昇をみた(図 3)。症例は 48 歳の女性で、臨床的に神経症状の報告はみられていない。

[考察]

前回、可溶性プリオン蛋白を認識する特異的モノクローナルを作製し、可溶性 PrP の検出系の構築を試みた。これらの抗体の解析も併せて報告した。これを元に、今回臨床材料の測定を試みた。臨床診断で得られた血漿材料の測定では、臨床診断との一致率は約 30%で、感度的には極めて低い結果であった。さらに ELISA 測定系での OD 値も低かった。これは感度によるものか、あるいは血漿中の sPrP の低濃度によるのかは不明である。後述のような MacGregor や Volkell らの測定方法は注目に値する。我々の検出系で反応する血漿中あるいは血清中の物質がどのようなサイズの蛋白か等の性状は現在免疫カラムなどを用いて分析中である。

血漿中のプリオン蛋白の検出は MacGregor らによって報告されているが、Volkell らは血漿中の可溶性プリオン蛋白を“time-resolved dissociation-enhanced fluorescence technology” の測定系にて測定

し、50pg/ml プリオン蛋白の感度をもって測定し、臨床的 CJD の 87%はコントロール群より高値を示し、他の神経異常疾患も全例でコントロール群の最高値より高値であったと報告している。さらにプリオン蛋白は可溶性プリオン蛋白と“pathogenic form”の PrP との鑑別が出来なかったと報告している。

Holada らは特異的モノクローナル抗体を用いてヒト赤血球などの血液成分との反応性を解析し、一つの sPrP 検出系の検討を報告している。

これらの報告と比較して、我々の測定方法は数段の遅れがある。用いた MAbs の反応部位の再検討と ELISA 測定面での改良の余地は必須である。

【参考文献】

- 1) ヒト型プリオン蛋白特異的モノクローナル抗体 #41 および #71 の解析と CJD における同抗体反応プリオン蛋白の局在；厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班 平成 11 年度研究報告書：p122-p129
- 2) 可溶性プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の作製；厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班 平成 12 年度研究報告書：p88-p95
- 3) Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N et al. (2000) Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. *Neurosci Lett* 288: 179-182.
- 4) MacGregor L, Hope J, Barnard G et al. (1999) Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox.Sanguinis* 77, 88-96.
- 5) Volkel D, Zimmerman K, Xerr I et al (2001) Immunochemical determination of cellular prion protein in plasma from healthy subjects and patients with sporadic CJD or other neurologic diseases. *Transfusion* 41: 441-448.
- 6) Holada K and Jaroslav G. (2000) Different level of prion protein (PrPc) expression on hamster, mouse and human blood cells. *Brit.J.Hematolo.* 110: 472-480.
- 7) Parizek P, Roeckl C, Weber J et al. (2001) Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuron cells. *J. Biol.Chem.* 276: 44627-32.

【研究発表】

1. 論文発表
- 1) 田中智之、北元憲利、村本 環、藤井秀治、阪本晴彦、吉田宗平、辻 力、北本哲之：ヒト型プリオン蛋白のコドン 219 polymorphism を認識する新しい単クローン抗体の作製 —その診断的価値—。 *病理と臨床*. 19 (1) : 91-93, 2001

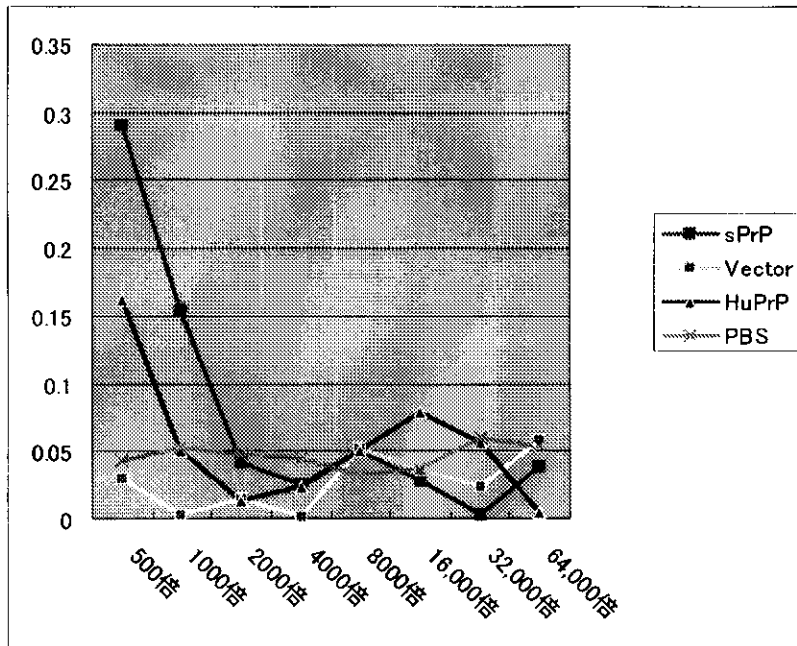


図1. ELISA 法によるプリオン蛋白測定感度

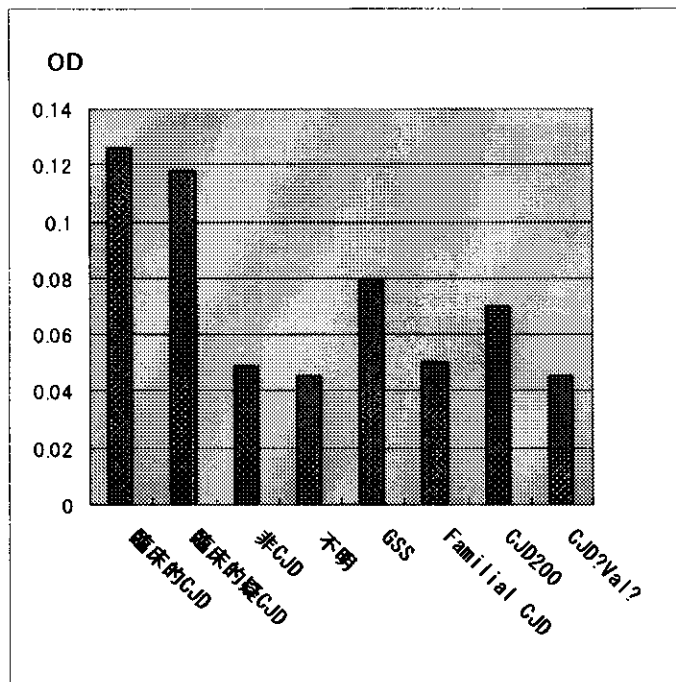


図2. ELISA 法による中枢神経疾患患者血漿中の可溶性プリオン蛋白測定

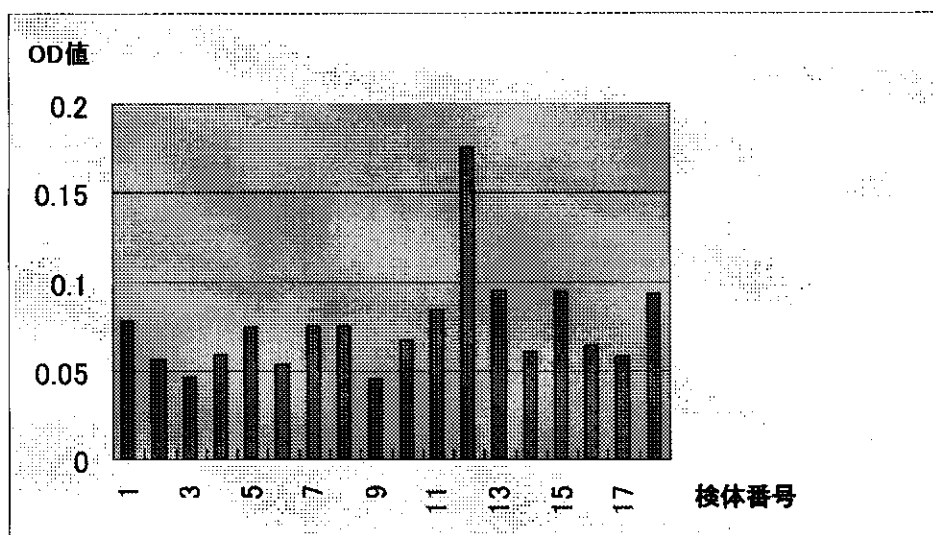


図3 正常人血清を用いた sPrP 測定

臨床診断	例数	高 OD 値症例
臨床的 CJD	27	7
臨床的 CJD 疑い	18	6
臨床的非 CJD	11	1
GSS 症例	5	1
Val 変異 CJD 疑い	6	1
家族性 CJD 疑い	2	0
非中枢神経系疾患	30	2

表1 中枢神経系疾患症例における sPrP 検出成績

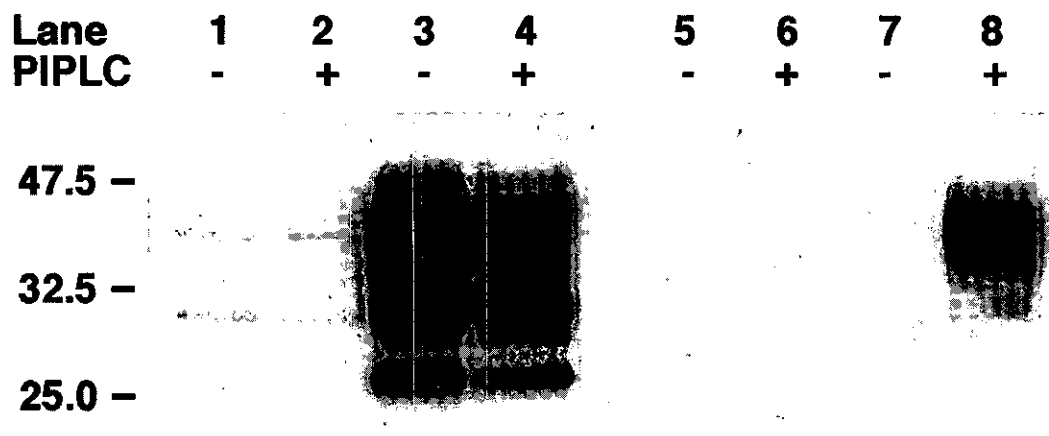


図4 ヒトプリオン蛋白のPIPLCによるCOS7細胞からのリリース

Lanes 1, 2, 5, 6はベクターDNAを、lanes 3, 4, 7, 8はヒトプリオン蛋白遺伝子を組込んだベクターDNAをそれぞれ取り込ませたCOS7細胞由来のサンプル。Lanes 1-4はPIPLC処理 (+) した、または無処理 (-) の細胞の溶解液。Lanes 5-8は細胞のインキュベーションに用いたリン酸バッファー[PIPLCを加えた(+)あるいは加えない (-)]。ヒトプリオン蛋白がPIPLC依存性に細胞からリリースされている (Lanes 7, 8)。COS7細胞の持つ内因性のプリオン蛋白の量は低レベルで (Lane 1)、PIPLCによってリリースされる量も検出限界以下である (Lane 6)。プリオン蛋白N末端に対するポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット。

PrP特異的パネルモノクローナル抗体の樹立

班 員：松田治男（広島大学・生物生産・免疫生物）
班 員：毛利資郎（九州大学・大学院医・動物施設）
班 員：北本哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：中村尚登（広島大学・生物生産・免疫生物）

〔研究要旨〕

PrPノックアウトマウスとニワトリを用いて、PrP特異的パネルモノクローナル抗体の樹立を試みた。リコンビナントヒトPrP23-230免疫ニワトリを用いた細胞融合実験から、2種のモノクローナル抗体（HUC4, 5）が得られ、共にPK切断部位の下流を認識していた。リコンビナントヒツジPrP125-234免疫PrPノックアウトマウスを用いた細胞融合実験からは1種の抗体（Sh3.9, IgG1）が得られた。この抗体を用いた感染細胞株のPrP^{sc}合成阻害試験では、PrP^{sc}の発現低下が観察されたことから、複製機構に重要な領域に結合していると思われる。一方、リコンビナントHuPrP23-230および122-230免疫ニワトリ脾細胞からのファージ発現抗体作成実験では、PK感受性および抵抗性領域の特異抗体が得られ、WBでも十分な反応性が確認された。

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

Haruo MATSUDA, Naoto NAKAMURA, Shirou MOHRI¹, and Tetsuyuki KITAMOTO²

Department of Immunobiology, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, ¹Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University and ²Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

We developed panel monoclonal antibodies (mAbs) against the prion protein (PrP) in PrP knockout mice and chickens. In fusion experiment using recombinant HuPrP23-230-immunized chickens, two kinds of anti-PrP monoclonal antibodies (HUC4 and 5) were generated. The both epitopes for these mAbs were mainly located at the position of 100-110 A.A of HuPrP. In fusion experiment using recombinant ShPrP125-234-immunized mouse, the mAb Sh3.9 was raised. In inhibition test on PrP replication, the Sh3.9 reduced the propagation of PrP^{sc} in cultured mouse neuroblastoma cells infected with PrP^{sc}. The finding indicates that Sh3.9 was recognized the important region for replication. On the other hand, some recombinant antibodies to PK-sensitive or -resistant PrP were generated by using spleen cells from the chicken immunized with HuPrP. These recombinant mAbs were useful for detection of mammalian PrP by Western blotting and ELISA.

〔はじめに〕

最近になって、抗体による異常型PrPの合成阻害効果（1-3）や、異常型PrPへの特異抗体樹立が報告されるようになり、治療・診断・研究の面で多種多様な抗体の樹立とその機能が重要視されるようになってきた。引き続き今年度も、細胞工学・免疫工学的手法を用いてニワトリとPrPノックアウトマウスからのPrP特異的パネル抗体の樹立を行った。また、PrP^{sc}高産生細胞株を免疫原とする抗体作成を再度行った。

〔目 的〕

異常プリオンタンパクを診断するイムノアッセイ法をよりの確にかつ高感度なものにするためには、信頼できるモノクローナル抗体を数多く作成することが重要である。本研究では、ニワトリとPrPノックアウトマウスを免疫動物として活用し、PK抵抗性領域PrP特異的モノクローナル抗体を樹立することを試みた。

〔材料と方法〕

1. 実験動物

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

2. 免疫

4週齢ニワトリに、pMal発現リコンビナントHuPrP (23-231, 121-230) を三週間おきに腹腔内へ免疫した。また、ノックアウトマウスにはリコンビナントヒトPrP121-230, ヒツジPrP125-234, ウシPrP133-241および感染細胞株3種を同様に免疫した。

3. 細胞融合による抗体作成

細胞融合実験は、ノックアウトマウスの免疫脾細胞とマウスミエローマ細胞株SP2/0を用いて常法に従って行った。また、ニワトリ細胞の融合実験は、免疫脾細胞とニワトリ融合用親株MuH1を用いて行った。

4. PrP特異的ファージ発現抗体の作成

それぞれの免疫原由来ファージ発現抗体ライブラリー (2.7×10^7 CFU/ μ g vector, 1.0×10^7 CFU/ μ g vector) を作成し、リコンビナントHuPrP23-230, MoPrP23-231等を抗原とするパニング法を用いてPrP特異的ファージ発現抗体を選抜した。

5. ELISA

ハイブリドーマ培養上清とファージ発現抗体の反応性は、ELISA法を用いた。免疫原をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清およびファージ発現抗体を加えて反応後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス κ 鎖抗体もしくはアルカリフォスファターゼ標識抗ニワトリIgG抗体を用いて検出した。

6. ウェスタンブロットニング

ウェスタンブロットニングは、正常マウス、ヒツジおよびウシ脳ホモジネート、感染マウス脳由来PrP^{Sc}ならびに感染細胞株ライセートを泳動サンプルとし、ファージ発現抗体もしくはハイブリドーマ由来抗体を一次抗体として使用した。検出は、peroxidase/ECLで行った。

7. 阻害実験

抗体を用いたPrP^{Sc}合成阻害実験は、感染細胞株3種 (N2a/22L, N2a/Chandler, N2a/Fukuoka) を用いて行った。 2.0×10^6 cells/dishで撒いた細胞培養液中に一定量の抗体を添加し、培養2, 3および4日目にライセートを作成。PK処理の後、peroxidase/ECL plusによるウェスタンブロットニングでPrP^{Sc}の有無を確認した。

〔結果〕

1) PrP特異的ニワトリモノクローナル抗体の作成

ヒトPrP23-230免疫脾細胞を用いた融合実験から、HUC4, 5の2クローンを得た。特にHUC4はWBやELISAでの反応性が高く、これまでに作成したHUC2に匹敵する反応性を有していた (図1)。これらの抗体の認識部位は合成ペプチドを抗原とするELISAで絞り込み、その結果、PK抵抗性領域のN末端を認識しているものと思われた (図2)。

2) PrP特異的ファージ発現抗体の作成

ヒトPrP23-230, 122-230それぞれの免疫脾細胞から調製したcDNAを材料に 2.7×10^7 CFU/ μ g vectorと 1.0×10^7 CFU/ μ g vectorのファージ発現抗体ライブラリーを得た。HuPrP23-230由来ライブラリーは、HuPrP23-230でパニングを行いクローニングした結果、PK感受性領域を認識するものとPK抵抗性領域を認識するものそれぞれが得られた (図3)。PK抵抗性領域認識抗体は、合成ペプチドを抗原とするELISAの結果から、HUC4, 5と同一領域を認識していることが分かった (図2)。これらのファージ発現抗体について、正常マウス・ヒツジおよびウシ脳から調製したPrPを用いてウェスタンブロットニングをしたところ、いずれの抗体もマウスPrPを特異染色した (図4)。HuPrP122-230由来ライブラリーは、HuPrP122-230とその領域に相当するマウス、ヒツジおよびウシPrPでパニング後クローニングした。その結果、ヒト・マウス・ヒツジ・ウシに反応するものとヒト・ヒツジに反応する2群に分類された (表1)。WBの結果から、これらの抗体のほとんどが二糖鎖型を認識できないことも分かった。また、感染マウス脳由来PrP^{Sc}では3バンドを検出できるが、感染細胞株では二糖鎖型を認識できない抗体も存在した (図3)。

3) PrPノックアウトマウスを用いたPrP特異的マウスモノクローナル抗体の作成

ヒトPrP122-230免疫ノックアウトマウスを用いた融合実験から、数多くのハイブリドーマが得られたが、いずれも非特異的な反応性を示すIgM型の抗体だった。ヒツジPrP125-234免疫ノックアウトマウスの融合実験からは、1種の抗体を得た(Sh3.9, IgG1)。この抗体は、ELISAとWBの結果からヒトおよびウシには反応しないことが確認された(図1)。感染細胞株を用いた抗体作成は、細胞融合が終了し現在スクリーニング中であるが、すでにいくつかの抗体が得られている。

4) 抗体による感染細胞株のPrP^{Sc}合成阻害試験

これまで作成してきたハイブリドーマ由来抗体の中でマウスPrPに反応する3種の抗体(HUC2,4およびSh3.9)を合成阻害試験に供試した。プレ実験の結果から、Sh3.9添加群でPrP^{Sc}の発現低下が認められた。続いて、抗体添加量と感染細胞株による阻害効果の違いを検討した。その結果、N2a/22Lでは、特に二糖鎖型の顕著な減少がみられた。その他2株では、経過時間に比例して全体的に消失傾向が認められた。なお、抗体添加量による大きな差は確認できなかった(図5)。

〔考 察〕

今回作成されたニワトリモノクローナル抗体の中でもHUC4は、反応性・特異性ともに非常に高く、高感度検出系に利用できると思われた。ニワトリへのリコンビナントヒトPrP23-230免疫実験により樹立された抗体の認識エピトープをまとめると、N末端からPK切断領域部位までであり、C末端側の抗体は得られないといった傾向が観察された。特に今回は、HUC4認識領域に対する抗体が融合実験以外にリコンビナント抗体としても得られ、この領域の抗原性の高さが示唆された。

ヒトPrP122-230免疫ニワトリ脾細胞から選抜されたりコンビナント抗体は、ウエスタンブロッティングの結果から、一糖鎖および無糖鎖型を認識しており、昨年度報告した#175と同じパターンになった。中には、感染細胞株(N2a/22L)の二糖鎖型は認識しないが、感染マウス脳由来のそれは認識する抗体も得られており、株を区別する抗体樹立の可能性があると推察される。

PrPノックアウトマウスを用いた抗体作成実験では、ヒト・ヒツジ・ウシPrPのPK抵抗性領域を免疫原として行ったが、非特異的結合をするものや抗体産生の消失するものがほとんどだった。その中でヒツジPrPに対する抗体Sh3.9が安定して増殖し、PrP^{Sc}合成阻害試験において有効性が認められた。感染細胞株3株のうち、特にN2a/ChandlerおよびN2a/Fukuokaでの阻害効果が大きかった。この効果が、株によるものか、その細胞株のPrP^{Sc}合成量によるものかが今後の検討課題である。

〔参考文献〕

- 1) Peretz D., Williamson R A., Kaneko K., Vergara J., Leclerc E., Schmitt-Ulms G., Mehlhorn I R., Legname G., Wormald M R., Rudd P M., Dwek R A., Burton D R., Prusiner S B.: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature (Lond.)*. 412: 739-743, 2001
- 2) Heppner F L., Musahl C., Arrighi I., Klein M A., Rulicke T., Oesch B., Zinkernagel R M., Kalinke U., Aguzzi A.: Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science*. 294: 178-182, 2001
- 3) Enari M., Flechsigg E., Weissmann C.: Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 9295-9299, 2001

〔研究発表〕

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

中村尚登, 堀内浩幸, 古澤修一, 松田治男: プリオンタンパクに対するニワトリモノクローナル抗体の樹立とその有用性 第31回日本免疫学会総会(大阪)2001年

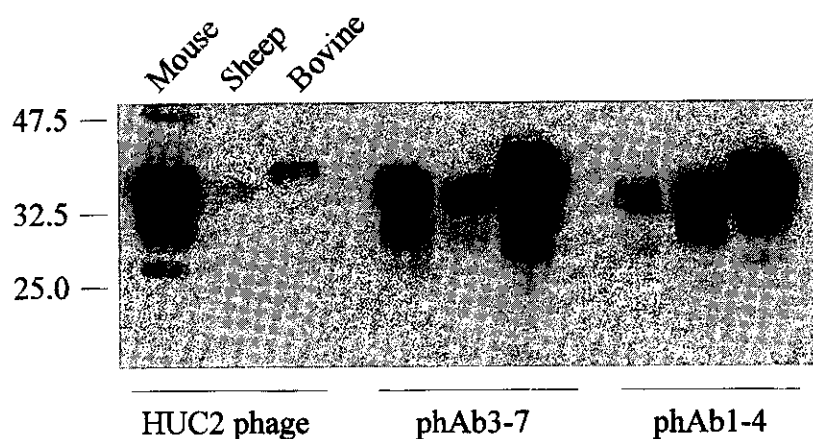


図2 正常型PrPに対するリコンビナント抗体の反応性

表1 PrP特異抗体の異種動物PrPに対する反応性

Antibody Name	Formation	Human	Mouse	Sheep	Bovine	PK-resistant PrP
HUC2	Native	+	+	+	+	-
HUC3	Native	+	±	+	+	+
HUC4, HUC5	Native	+	+	+	+	+
phAb1-4	scFv	+	+	+	+	-
phAb2-1	scFv	+	+	+	+	-
phAb3-7	scFv	+	+	+	+	+
phAb3-15	scFv	+	+	+	+	+
phAb4-3	scFv	+	+	+	+	+
phAb4-12	scFv	+	+	+	+	+
phAb4-19	scFv	+	+	+	+	+
phAb4-30	scFv	+	-	+	-	NT
Sh3.9	Native	-	+	+	-	+
# 175	Native	+	±	NT	NT	+

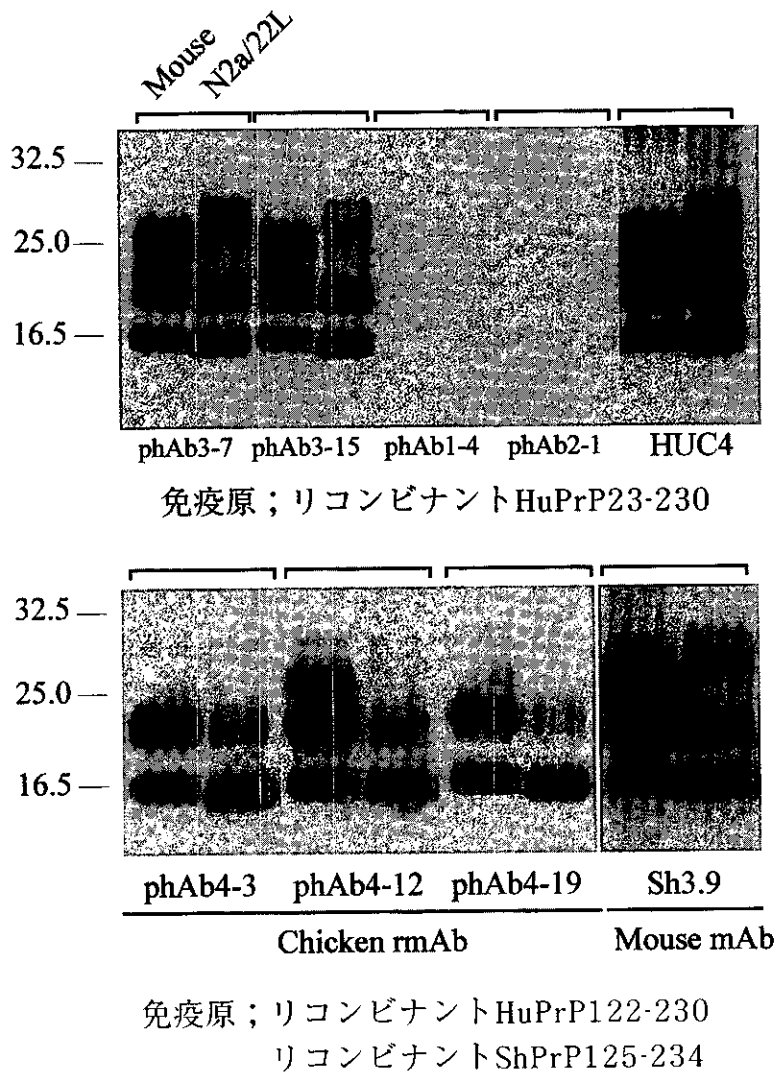


図3 PK処理PrPに対するモノクローナル抗体の反応性

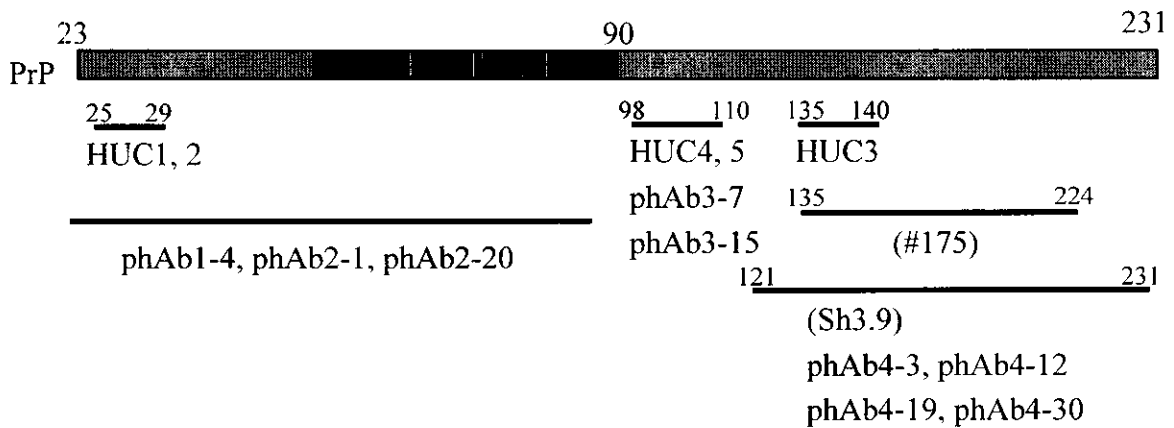


図4 樹立抗体の認識エピソード領域

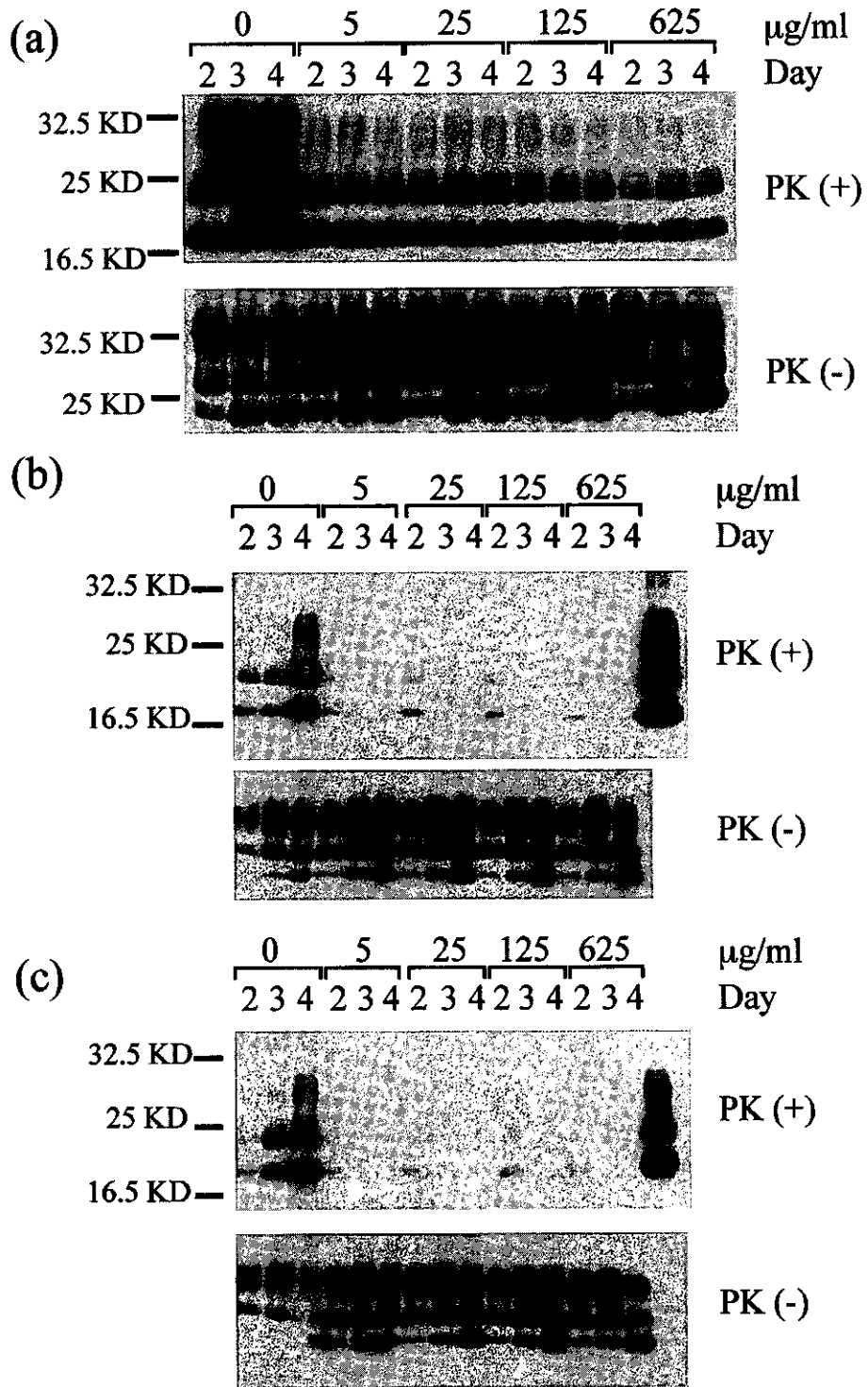


図5 Sh3.9のPrP^{Sc}合成阻害効果試験
(a) N2a/22L
(b) N2a/Chandler
(c) N2a/Fuluoka

免疫磁性ビーズによる PrP^{Sc} 検出法の開発

班 員：品川 森一（帯広畜産大学・獣医公衆衛生）
研究協力者：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）
研究協力者：毛利 崇（帯広畜産大学・獣医公衆衛生）
研究協力者：梅谷 淳（富士レビオ（株）・帯広研究所）
研究協力者：松井 利生（富士レビオ（株）・帯広研究所）

〔研究要旨〕

免疫生化学的なプリオン病診断法を高感度化する為には試料中に微量に存在する PrP^{Sc} を濃縮して検出する必要がある。PrP^{Sc} の濃縮法として遠心操作が一般的に用いられているが遠心操作は多検体の検査には時間がかかる為に適さない。そこで、抗 PrP 抗体でコーティングした磁性ビーズによる PrP^{Sc} の選択的な濃縮法について検討した。免疫磁性ビーズによる PrP^{Sc} の回収は PrP^{Sc} を 2.6 M 以上のチオシアン酸グアニジン(GdnSCN)によって変性させた後に希釈して GdnSCN 濃度を 0.42 M 以下に下げる事によって可能となる事が判明した。免疫磁性ビーズの使用により、遠心操作を一切行うことなしに PrP^{Sc} の回収が可能となった。回収した PrP^{Sc} の検出はビーズ上でビオチン化抗 PrP Fab'フラグメントにより ELISA を行うことでも検出できた（免疫磁性ビーズ ELISA）。免疫磁性ビーズによる PrP^{Sc} の濃縮法はプリオン病の診断技術の向上ならびに PrP^{Sc} の生化学的解析の為に有効な道具となるであろう。

Development of method for the detection of PrP^{Sc} by immuno-magnetic beads

Morikazu SHINAGAWA¹, Takashi MOHRI¹, Motohiro HORIUCHI^{1,2}, Atsushi UMETANI³, and Toshio MATSUI³

¹Department of Veterinary Public Health, and ²Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

³Obihiro Research Laboratory, Fujirebio Inc.

ABSTRACT

Concentration of PrP^{Sc} is required to improve the sensitivity for PrP^{Sc} detection in immuno-biochemical method. A centrifugation is often used for the concentration of PrP^{Sc}, however, it is time-consuming procedure in the high throughput screening. In this study we attempted to use an immuno-magnetic beads for a selective concentration of PrP^{Sc}. We found that PrP^{Sc} could be recovered by the immuno-magnetic beads coated with anti-PrP monoclonal antibody when PrP^{Sc} was denatured with over 2.6 M GdnSCN and following dilution of the sample to GdnSCN concentration below 0.42 M. No centrifugation is required through the entire process. PrP^{Sc} recovered by the immuno-magnetic beads could be detected directly on the beads by ELISA using Fab' fragment of biotinylated-anti PrP monoclonal antibody and HRP-conjugated streptavidin. The concentration of PrP^{Sc} by immuno-magnetic beads will be useful for the improvement of diagnostic methods of prion diseases as well as biochemical analysis of PrP^{Sc}.

〔はじめに〕

現在使用されているプリオン病の診断法は蛋白分解酵素による PrP^C の消化の後に PrP^{Sc} を変性

剤処理し、抗 PrP 抗体によって検出する(1, 2)。これらの診断法の感度を上げる為には PrP^{Sc} を濃縮する過程が必要不可欠である(1, 2)。遠心操作は PrP^{Sc} の濃縮に有効であるが、多検体のスクリーニングが必要な場合には律速段階となるため、遠心操作に変わる PrP^{Sc} 濃縮法の開発が望まれている。また、PrP^{Sc} の選択的な濃縮はプリオン病の基礎研究においても有用な道具となる。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、免疫磁性ビーズで回収した PrP^{Sc} を直接磁性ビーズ上で検出する免疫磁性ビーズ ELISA 法がプリオン病の診断に応用可能であるかどうかについて検討した。

〔材料と方法〕

PrP^{Sc} 粗画分はスクレイピーObihiro 株感染マウス脳組織から Grathwohl らの方法(3)に準じて調整した。PrP^{Sc} 粗画分は 3 M グアニジンチオシアン酸(GdnSCN)で変性させ、抗原抗体反応がおこる GdnSCN 濃度まで希釈後に実験に供試した。Captured ELISA により、抗原補足用抗体および検出用抗体の組み合わせを検討した。モノクローナル抗体は無血清高密度培養にて回収したハイブリドーマ培養上清から硫酸塩析後、ゲル濾過により精製した。精製モノクローナル抗体をペプシン処理後に、メルカプトエタノールアミンで還元して Fab'フラグメントを調製した。得られた Fab'フラグメントは MBCC-biotin によりビオチン化した。マウス(Mo)および牛(Bo)組み換え PrP(rPrP)は原核細胞発現ベクター-pRSETB にて発現させ、封入体を精製後、Ni²⁺をチャージした IMAC および逆相 HPLC により分子内ジスルフィド結合を有する分子を精製した。磁性ビーズは DYNAL 社のプロテイン G 結合磁性ビーズを用いた。3 M GdnSCN で変性させた試料を 0.4 M GdnSCN になるように PBS で希釈し、抗 PrPmAb と磁性ビーズを加え室温で 2 時間反応させた。磁性ビーズはマグネットセパレーターを使用して 1%Triton X-100 を含む PBS で 3 回洗浄した。磁性ビーズに吸着した PrP^{Sc} は SDS-PAGE sample buffer で溶出してウエスタンブロットに供試した。ウエスタンブロット後の免疫染色にはビオチン化 mAb31C6 を一次抗体、HRP 標識ストレプトアビジンを二次抗体として用いた。PrP^{Sc} を回収した磁性ビーズを直接検出するために、ビオチン化 mAb31C6 を一次抗体、HRP 標識ストレプトアビジンを二次抗体として免疫反応を行い、ABTS にて発色させた。

（倫理面への配慮）

本研究にはスクレイピー実験感染マウスの脳組織を使用した。動物実験は帯広畜産大学「動物実験委員会」の承認のもとに、本学動物実験指針に従って実施した。

〔結果〕

抗原抗体反応を阻害しない濃度を調べる目的で、3 M GdnSCN で変性させた非感染マウス由来試料を希釈してそこに一定量の MorPrP をスパイクした試料を用いて captured ELISA を行った (Fig.1)。その結果、0.4 M 以下の GdnSCN 濃度で抗原抗体反応により PrP を検出できることが明らかとなった。また、8 種の抗 PrP 抗体の組み合わせから抗原補足用抗体および検出用抗体の最適な組み合わせを検討したところ、mAb44B1 を抗原補足用抗体、mAb72-5 を検出用抗体とする組み合わせで、感度および非特異反応の面で良い成績が得られた (Fig.2)。Captured ELISA の感度は MorPrP を用いた場合 195 pg、BorPrP を用いた場合 391 pg であった (Fig.3)。免疫磁性ビーズによる PrP^{Sc} の濃縮はスクレイピー感染マウス脳組織より調整した試料をプロテナーゼ K 消化した後に 2.6 M 以上の GdnSCN によって PrP^{Sc} を変性させ、抗原抗体反応を阻害しないように GdnSCN 濃度を 0.42 M 以下に下げた場合に可能となった (Fig.4)。検討した抗体の中では mAb44B1 で最も効率よく PrP^{Sc} を回収する事が可能であった。プロテイン G と結合しないビオチン化 Fab'フラグメントを検出抗体として用いる事で回収した PrP^{Sc} を磁性ビーズ上で直接検出する磁性ビーズ ELISA 法が可能となった (Table 1)。その有効性を確認する為にウエスタンブロット、Captured ELISA および免疫磁性ビーズ ELISA の検出感度をスパイク試験にて比較した。ウエスタンブロッ

トでは 2^{-8} 希釈した試料まで、Captured ELISA では遠心分離による濃縮操作をした場合には 2^{-14} 、濃縮操作をしない場合には 2^{-9} まで検出可能であった。免疫磁性ビーズ ELISA は 2^{-7} が検出限界であった (Fig.5)。それぞれの実験には高い再現性があった。

〔考察〕

PrP^{Sc} を GdnSCN などのカオトロピック試薬で変性させることにより PrP^{Sc} の抗 PrP 抗体に対する反応性が著しく上昇することが知られている(4)。これは抗 PrP 抗体のエピトープが変性により露出するためである。しかし、高濃度変性剤の存在下では抗原抗体反応が阻害されるために、変性剤を除去あるいは希釈する必要がある。本研究では変性剤として GdnSCN を使用し、変性条件と抗原抗体反応時の条件を詳細に検討することで、PrP^{Sc} の変性に使用した GdnSCN を希釈するだけで、抗原抗体反応による PrP^{Sc} の検出が可能であることを明らかにした。しかし、使用する抗体により抗原抗体反応が起こる GdnSCN の許容濃度が異なることから、使用する抗体により変性剤濃度の最適化を行う必要がある。このことにより、captured ELISA および免疫磁性ビーズ上での ELISA による PrP^{Sc} の検出が可能となった。免疫磁性ビーズを使用した PrP^{Sc} の回収・検出法は、試料調製から一切遠心操作を行わずに遂行できることから、現行法よりも簡便な BSE 多検体スクリーニング法の開発に応用可能かもしれない。免疫磁性ビーズ ELISA はバックグラウンドが高かった為に Captured ELISA に匹敵する感度を得る事が出来なかった。今後磁性ビーズの材質を含め反応条件を詳細に検討することで高感度化を計る必要がある。免疫磁性ビーズでは選択的な PrP^{Sc} の濃縮が可能なることから、医薬品原料などから微量に含まれるかもしれない PrP^{Sc} の検出等にも応用可能と思われる。今回使用した Capture 抗体あるいは検出抗体は羊および牛の PrP に対しても反応する抗体から選抜しており、実際に BSE 感染牛の延髄から PrP^{BSE} を検出できることも確認済みである。

〔結論〕

免疫磁性ビーズによる PrP^{Sc} の濃縮法によって遠心操作を一切省いた試料調整で PrP^{Sc} を回収することが可能となった。また、回収した PrP^{Sc} をビーズ上で直接検出する免疫磁性ビーズ ELISA の実施も可能となった。今後は免疫磁性ビーズの材質を含め反応条件を詳細に検討してバックグラウンドを下げる、あるいはさらなる反応条件の最適化による高感度化を進める事が課題である。磁性ビーズは固液分離が容易な事から全自動検出系への適用が可能であることから、迅速で簡便な多検体の診断法に応用可能と考えられる。

〔参考論文〕

- 1) Doi, S., Ito, M., Shinagawa, N., Sato, G., Isomura, H., and Goto, H.: Western blot detection of scrapie-associated fibril protein in tissues outside the central nervous system from preclinical scrapie-infected mice. *J. Gen. Virol.* 69: 955-960, 1988
- 2) Race, R. E., and Ernst, D.: Detection of proteinase K-resistant prion protein and infectivity in mouse spleen by 2 weeks after scrapie agent inoculation. *J. Gen. Virol.* 73:3319-3323.
- 3) Grathwohl, K. U., Horiuchi, M., Ishiguro, N., and Shinagawa, M.: Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice. *J. Virol. Methods.* 64:205-216, 1997
- 4) Serban, D., Traboulos, A., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B.: Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion protein. *Neurology.* 40:110-117, 1990

〔研究発表〕

- 1.論文発表