

厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山崎 壮

平成14年(2002年)4月

## 目次

I. 総括研究報告書	
異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発 山崎 壮	1
II. 分担研究報告書	
1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究 山崎 壮	4
2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究 －Proteinase K 処理抵抗性プリオン蛋白質を発現する培養細胞の解析－ 菊池 裕	6
3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究 －抗プリオン蛋白質抗体パネルの作製－ 堀内 基広	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
総括研究報告書

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

主任研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

プリオン病病原体であるプリオン（PrP<sup>Sc</sup>）の検出法としては、バイオアッセイ法とイムノアッセイ法があるが、それぞれ一長一短がある。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP<sup>Sc</sup> 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在のイムノアッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、培養細胞を用いたバイオアッセイ法および PrP<sup>Sc</sup> に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法を開発を行う。

本年度は、1) PrP<sup>Sc</sup> に対して高感受性の培養細胞株の開発するために、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にしてウシ正常プリオン蛋白質（BoPrP<sup>C</sup>）を発現するトランスフェクタントの作製を行った。2) ウシとヒトで共通なアミノ酸配列部位を認識する抗体を含むマウス抗 rBoPrP 抗血清を調製した。また、PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞の樹立を目的とし、ヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G の PrP の発現機構を調べた。T98G 細胞を G1 期に誘導すると PrP<sup>C</sup> 産生量が増大すること、長期間の継代後に播種すると Proteinase K 消化に抵抗性の PrP<sup>Res</sup> を産生することを見いだした。3) プリオン病の研究に広く応用可能な PrP 分子に対するモノクローナル抗体パネルの作製を試みた。34 クローンの抗 PrP モノクローナル抗体を樹立した。作製した抗体は認識するエピトープから 9 群に分類可能であった。PrP<sup>Sc</sup> の構造エピトープを認識し、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な抗体が 1 クローン得られた。

分担研究者

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 主任研究官  
堀内 基広 帯広畜産大学 原虫病研究センター 助教授

A. 研究目的

現在、様々なウシ由来またはヒト由来の医薬品、化粧品、医療品、およびウシ由来の食品が利用されている。そのため、それらのプリオン汚染の迅速で高感度な検出法の確立が急務である。プリオン病病原体であるプリオン（異常型プリオン蛋白質、PrP<sup>Sc</sup>）の検出法としては、バイオアッセイ法とイムノアッセイ法がある。バイオアッセイ法は高感度で信頼性のある方法であるが、迅速性と簡便性に欠ける。一方、イムノアッセイ法は迅速で簡便であるが検出感度が劣る。それぞれ異なった長所と短所があり、現在目的に応じて使い分けている。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP<sup>Sc</sup> 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在のイムノアッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、新たな原理による PrP<sup>Sc</sup> 汚染のインビトロ検出法を開発を行う。そのために、培養細胞を用いたバイオアッセイ法および PrP<sup>Sc</sup> に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法を開発を行う。バイオアッセイ法は、正常型プリオン蛋白質（PrP<sup>C</sup>）を発現している培養細胞を用い、外来性のプリオン蛋白質（PrP）や

プリオン蛋白質ペプチドの細胞表面への結合やそれらが誘起する細胞内での反応を解析することによって、感染初期に判定可能な PrP<sup>Sc</sup> の検出法を開発を行う。また、これまで培養細胞での感染実験系がないヒトプリオン、ウシプリオンに適用できる高感受性の培養細胞株の開発もめざす。インビトロ検出法は、PrP<sup>Sc</sup> に特異的に結合するモノクローナル抗体、蛋白質およびペプチド等のリガンドを分子プローブとして、PrP<sup>Sc</sup> を無細胞系で簡便に検出する方法の開発を行う。

B. 研究方法

1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究

ウシ正常プリオン蛋白質（BoPrP<sup>C</sup>）発現トランスフェクタントを作製するために、基となるウシ培養細胞株としてウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を選択した。BCE C/D-1b 細胞でウシ PrP mRNA が発現していることを RT-PCR 法で確認した。ウシ大脳皮質から RT-PCR 法で調製したウシ PrP コード領域 cDNA をほ乳類動物発現用ベクターに組み込み、BCE C/D-1b 細胞に導入した。

2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究

PrP<sup>Sc</sup> の高感度検出法を開発を目的とし、組換えウシプリオン蛋白質（rBoPrP）でマウスを免疫して抗血清を調製し、抗体の反応性を調べた。また、PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞の樹立を目的とし、ヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G の PrP の発現機構と産生された PrP の Proteinase K 抵抗性を調

べた。

### 3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究

プリオン病の高感度診断法の開発をはじめ、プリオン病の研究に広く応用可能な PrP 分子に対するモノクローナル抗体パネルの作製を試みた。PrP 遺伝子欠損マウスに 1) スクレイピー感染マウス脳から精製した感染性を有する PrP<sup>Sc</sup>、2) 大腸菌で発現させた組み換えマウス PrP(rMoPrP)を免疫して、常法に従って mAb を作製した。抗体が認識するエピトープと PrP の種特異性の解析を行った。また、抗体が認識する PrP の細胞内局在を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム解析研究に関する倫理指針を遵守して研究を行った。本研究計画で用いるヒト由来の試料に関する研究は、一般的な研究用試料等として分譲されている細胞、DNA 等の匿名化された試料又は遺伝情報を用いて行った。また、本研究の動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験倫理委員会および帯広畜産大学の動物委員会が定めた動物実験倫理規定に従って実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究

ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b にプリオン蛋白質 mRNA が発現してしていることを確認した。BCE C/D-1b 細胞を基にしてウシ PrP<sup>C</sup> を発現するトランスフェクタントの作製を行った。次年度は、トランスフェクタントに対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

#### 2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究

rBoPrP でマウスを免疫して得られた抗血清は、ウシとヒトのプリオン蛋白質 (PrP) で共通なアミノ酸配列(ウシ 153-171 残基とヒト 142-160 残基)に相当するペプチドに ELISA で反応性を示したことから、エピトープとしてウシとヒトの共通部位を認識する抗体を含むことが示唆された。

T98G を接触阻止がかかった高細胞密度下で培養して PrP を高発現させ、全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)を調製して Proteinase K 処理後にイムノブロット法を行った。短期間の継代後に調製した WCL は酵素処理で PrP が消失したが、長期間継代後の WCL では N 末端だけが消化された酵素処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP<sup>Res</sup>)が検出された。次年度は、T98G 細胞の PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞としての適用を試みる予定である。

#### 3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究

PrP 分子に対するモノクローナル抗体として、計 34 の mAb を樹立し、その性状を詳細に解析した。mAb は認識するエピトープから大きく 9 群

に分類できた。このうち 8 群は PrP<sup>C</sup> と変性 PrP<sup>Sc</sup> に反応する pan-PrP 抗体に属する。Pan-PrP 抗体のうち 6 群は PrP 分子上の aa59-89(I), aa119-127(II), aa137-145(III), aa143-153(IV), aa161-169(V), aa219-229(VI)のリニアエピトープを認識し、残りの 2 群は aa155-231(VII)、aa89-231(VIII)から構成される構造エピトープを認識した。このように PrP 分子上の異なる 8 箇所のエピトープを認識する mAb パネルが作製できた。また rMoPrP とは反応しないが精製 PrP<sup>Sc</sup> と反応する抗体(IX)が 1 クローン得られた。PrP<sup>Sc</sup> を変性剤で処理するとこの抗体は反応しなくなることから、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な抗体である可能性が示唆された。

### D. 考察

これまでのプリオン感染研究でも培養細胞は利用されてきたが、ごく限られた細胞株しかプリオン感染せず、多くの培養細胞株はプリオン感染に抵抗性であることが知られている。しかし、プルシナーら(2000 年)が、特定のマウス継代プリオン株に対してのみではあるが、プリオン感染に高感受性の培養細胞サブクローンを樹立した。細胞内に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することを検出することで PrP<sup>Sc</sup> のインビトロバイオアッセイができる可能性を示した。そこで本研究では、これまで培養細胞での感染実験系がないヒトプリオン、ウシプリオンに適用できる高感受性の培養細胞株の開発もめざすことにした。

長期間の継代後に播種したヒト・グリオーマ T98G 細胞は、10 µg/ml の Proteinase K 消化に抵抗性の PrP<sup>Res</sup> を産生した。この PrP<sup>Res</sup> は、PrP<sup>Sc</sup> と同様に、N 末端は酵素消化されるが C 末端側は抵抗性を示した。一方、短期間の継代後に播種した T98G 細胞では PrP の抵抗性は、5-10 分間の Proteinase K 消化に抵抗性を示す部分的なものだった。一般に、遺伝型 CJD の患者由来の PrP<sup>Sc</sup> は 1-10 µg/ml の、散発型 CJD や BSE の PrP<sup>Sc</sup> は 20-50 µg/ml の Proteinase K 処理に抵抗性を示す。T98G 細胞が発現した mRNA の塩基配列は、PrP 遺伝子(AY008282)の塩基配列と一致し、現在知られている遺伝型 CJD に相当する変異はなかった。

今回樹立した mAb は認識するエピトープから大きく 9 群に分類できた。このうち 8 群は PrP 分子上の 8 箇所の異なるエピトープを認識する pan-PrP 抗体であるが、同じ群に分類した抗体の中にも性状が異なるものが含まれる。今後さらに詳細な解析を行い、これらを異なる群に分類すべきかを判断する必要がある。また、IX 群に分類した mAb6H10 は PK 処理した未変性 PrP<sup>Sc</sup> とは反応するが、これを 3M GdnSCN で変性させると反応しなくなること、rMoPrP とは反応しないことから、pan-PrP 抗体とは明らかに異なる性状を示した。PrP<sup>Sc</sup> の構造エピトープを認識し、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な抗体である可能性が考

えられる。

#### E. 結論

- 1) ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして BoPrP<sup>C</sup> を発現するトランスフェクタントの作製を行った。
- 2) ウシとヒトで共通なアミノ酸配列部位を認識する抗体を含むマウス抗 rBoPrP 抗血清を調製した。また、T98G 細胞を G1 期に誘導すると PrP<sup>C</sup> 産生量が増大すること、長期間の継代後に播種すると Proteinase K 消化に抵抗性の PrP<sup>res</sup> を産生することを見いだした。
- 3) 34 の抗 PrP モノクローナル抗体を樹立した。作製した抗体は認識するエピトープから 9 群に分類可能であった。PrP<sup>Sc</sup> の構造エピトープを認識し、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な抗体が 1 クローン得られた。

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.*, 2002 (in press)
- 2) 武木田薫、菊池裕、山崎壮、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄：競合的 ELISA による食品試料中のプリオン蛋白質検出に関する検討、*食品衛生学雑誌*、2002 (in press)
- 3) 山崎壮：プリオン病を知るための情報ガイド、*食品衛生学雑誌*、43 (2): J185-J190 (2002)
- 4) Horiuchi, M., Baron, G., Xiong, L.-W., and Caughey, B. Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.* 276: 15489-15497 (2001)
- 5) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63(9): 983-990 (2001)

- 6) 品川森一、堀内基広、松井高峯 プリオンの免疫学的検出法 *生活衛生*、45: 259-269 (2001)
- 7) 池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 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 (2002)
- 8) 堀内基広 動物のプリオン病 ウイルス、51(2): 145-150 (2002)

##### 2. 学会発表

- 1) 武木田薫、谷村顕雄、菊池裕、山崎壮、高鳥浩介、棚元憲一、品川森一、澤田純一：抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用いた食品中のプリオンタンパク質検出法の開発 日本食品衛生学会第 82 回学術講演会、2001 年 10 月、長崎
- 2) Horiuchi, M.: Detection of PrP<sup>Sc</sup> for the diagnosis of prion diseases, 5th International Symposium on Infectious Disease, Chunju/Korea (2001)
- 3) Horiuchi, M.: Inhibition of pathogenic prion protein formation; implication for possible therapeutic target, Forum for Infectious Disease of the 21th Century, Osaka (2002)
- 4) 堀内基広：動物プリオン病診断法の現状と課題、Brain 国際フォーラム 東京(2001)
- 5) 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 東京(2001)
- 6) 堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP 合成ペプチドによる PrP 分子間相互作用の阻害、第 131 回日本獣医学会 東京(2001)
- 7) 毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一：免疫磁性ビーズを用いた PrP<sup>Sc</sup> 検出法の開発、第 49 回日本ウイルス学会 大阪(2001)
- 8) 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：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 大阪(2001)
- 9) 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一：精製 PrP<sup>Sc</sup> 画分と特異的に反応する mAb6H10 の解析、第 49 回日本ウイルス学会 大阪(2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞株の開発に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 山崎 壮

研究要旨

本研究では、外来性の異常型プリオン蛋白質に対する感染性、細胞表面への結合性、細胞内に誘起される反応などを指標にして、異常型プリオン蛋白質に対して高感受性の培養細胞株（トランスフェクタント）の開発を行うことをめざす。これまで培養細胞での感染実験系がないウシプリオンに適用できる培養細胞系の開発を目的に、基とするウシ培養細胞株として、今回、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を選択した。BCE C/D-1b 細胞にプリオン蛋白質 mRNA が発現していることを確認した。BCE C/D-1b 細胞を基にしてウシ正常プリオン蛋白質発現トランスフェクタントの作製を行った。次年度は、トランスフェクタントに対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

A. 研究目的

プリオン病病原体であるプリオン（異常型プリオン蛋白質、PrP<sup>Sc</sup>）の検出法としては、バイオアッセイ法と免疫アッセイ法がある。バイオアッセイ法は高感度で信頼性のある方法であるが、迅速性と簡便性に欠ける。一方、免疫アッセイ法は迅速で簡便であるが検出感度が劣る。それぞれ異なった長所と短所があり、現在目的に応じて使い分けられている。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP<sup>Sc</sup> 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究班では、PrP<sup>Sc</sup> の迅速、簡便で高感度なインビトロ検出法の開発をめざす。その中で筆者らは、培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発をめざして、外来性の PrP<sup>Sc</sup> に対する感染性、細胞表面への結合性、細胞内に誘導される反応などを指標にして、PrP<sup>Sc</sup> に対して高感受性の培養細胞株（トランスフェクタント）の開発研究を分担する。

平成 13 年度（初年度）は、基とするウシ培養細胞株を選択し、ウシ正常プリオン蛋白質（BoPrP<sup>C</sup>）発現トランスフェクタントの作製を行った。

B. 研究方法

1. BCE C/D-1b 細胞におけるプリオン蛋白質（PrP）mRNA の発現

ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b（JCRB9129、ATCC CRL-2048 由来）は JCRB から分譲を受けた。培養した細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法でウシ PrP mRNA の PrP コード領域由来の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。

2. ウシ PrP<sup>C</sup> 発現トランスフェクタントの作製

ウシ大脳皮質から RT-PCR 法でウシ PrP コード領域 cDNA（BoPrP cDNA）をクローン化した。これをほ乳類動物発現用ベクター pcDNA3.1 に組み込んだ。また、BoPrP cDNA を Gateway Cloning System 用ベクター pENTR1A に組み込

んだ後、ほ乳類動物発現用ベクター pDEST12.2 に組み込んだ。得られた 2 種類の発現用プラスミドを BCE C/D-1b 細胞に導入した。

C. 研究結果

1. BCE C/D-1b 細胞における PrP mRNA の発現

BoPrP<sup>C</sup> を高発現するトランスフェクタント細胞株を樹立することを目的に、公的細胞バンクが分譲している細胞株の中から、基とするウシ培養細胞株を選択した。今回ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を選択した。この細胞株は細胞外マトリックスを産生することから、神経細胞やアストロサイトの培養でフィーダー細胞として利用されている。この細胞株を基にトランスフェクタントを樹立した場合には、神経細胞との共培養も可能と期待できる。

BCE C/D-1b 細胞から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR を行った結果、ウシ大脳由来 mRNA を用いて RT-PCR を行った場合と同様に、約 850bp の PCR 産物を確認した。報告されているウシ PrP mRNA の塩基配列から予想される PCR 産物鎖長 846 bp と長さが一致した。したがって、BCE C/D-1b 細胞では BoPrP mRNA が発現していると考えられる。

2. ウシ PrP<sup>C</sup> 発現トランスフェクタントの作製

ウシ PrP コード領域の cDNA を pBluescript II SK(+)ベクターにクローニングした後、プラスミドからクローン化 DNA 断片（BoPrP cDNA）を切り出し、ほ乳類動物発現用ベクターである pcDNA3.1 ベクターと pDEST12.2 ベクターにサブクローニングした。得られた発現用プラスミドをカチオニックリポソーム法で BCE C/D-1b 細胞に導入し、現在トランスフェクタントのクローニングを行っている。

D. 考察

PrP<sup>Sc</sup> の検出法としては、バイオアッセイ法と免疫アッセイ法があるが、それぞれ一長一短が

ある。そこで、本研究班では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在のイムノアッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、新たな原理によるインビトロ検出法の開発に取り組むことにした。その方法のひとつが、培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発である。

これまでのプリオン感染研究でも培養細胞は利用されてきたが、ごく限られた細胞株しかプリオン感染せず、多くの培養細胞株はプリオン感染に抵抗性であることが知られている。しかし、プルシナーら(2000年)が、特定のマウス継代プリオン株に対してのみではあるが、プリオン感染に高感受性の培養細胞サブクローンを樹立した。細胞内に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することを検出することで PrP<sup>Sc</sup> のインビトロバイオアッセイができる可能性を示した。そこで本研究班では、PrP<sup>Sc</sup> が細胞内に蓄積するのを検出する方法だけではなく、PrP<sup>Sc</sup> が培養細胞に作用した際に誘起される細胞内反応や関与する分子を解析し、その生化学反応を捕らえて PrP<sup>Sc</sup> を検出することを試みることにした。正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) を発現している培養細胞を用い、外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの細胞表面への結合やそれらが誘起する細胞内での反応を解析することによって、感染初期に判定可能な PrP<sup>Sc</sup> の検出できるかもしれないと考える。また、これまで培養細胞での感染実験系がないヒトプリオン、ウシプリオンに適用できる培養細胞系の開発もめざす。筆者らは、PrP<sup>Sc</sup> に対して高感受性の培養細胞株として PrP<sup>C</sup> を高発現するトランスフェクタント細胞株を開発する研究を分担する。

今年度は、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b にプリオン蛋白質 mRNA が発現してしていることを確認した。BCE C/D-1b 細胞を基にしてウシ PrP<sup>C</sup> を発現するトランスフェクタントの作製を行った。次年度は、トランスフェクタントに対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

#### E. 結論

平成 13 年度は、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b にプリオン蛋白質 mRNA が発現してしていることを確認した。BCE C/D-1b 株を基にしてウシ PrP<sup>C</sup> を高発現するトランスフェクタントの作製を行った。次年度は、トランスフェクタントに対する外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの作用を解析する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 武木田薫, 谷村顕雄, 菊池裕, 山崎壮, 高鳥浩介, 棚元憲一, 品川森一, 澤田純一: 抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用いた食品中のプリオンタンパク質検出法の開発 日本食品衛生学会 第 82 回学術講演会、2001 年 10 月、長崎

##### 2. 論文

- 1) Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.*, 48: 2002 (in press)
- 2) 武木田薫, 菊池裕, 山崎壮, 掛谷知志, 高鳥浩介, 棚元憲一, 澤田純一, 谷村顕雄: 競合的 ELISA による食品試料中のプリオン蛋白質検出に関する検討、*食品衛生学雑誌*, 43: 2002 (in press)
- 3) Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: G<sub>1</sub>-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G.. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 2002 (in press)
- 4) 山崎壮: プリオン病を知るための情報ガイド、*食品衛生学雑誌*, 43 (2): J185-J190 (2002)

#### G. 協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 掛谷知志(リサーチ・レジデント)

異常型プリオンタンパク質汚染のインビトロ高感度検出法の開発に関する研究  
-Proteinase K 処理抵抗性プリオン蛋白質を発現する培養細胞の解析-

分担研究者 菊池裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究要旨

異常プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の高感度検出法の開発を目的とし、組換えウシ・プリオン蛋白質(rBoPrP)でマウスを免疫して抗血清を調製し、ELISA 及びイムノブロット法で rBoPrP を認識することを確認した。得られた抗血清はウシとヒトのプリオン蛋白質(PrP)で共通なアミノ酸配列(ウシ 153-171 残基とヒト 142-160 残基)に相当するペプチドに ELISA で反応性を示したことから、エピトープとしてウシとヒトの共通部位を認識する抗体を含むことが示唆された。

また、PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞の樹立を目的とし、ヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G の PrP の発現機構を調べた。T98G を接触阻止がかかった高細胞密度下で培養して PrP を高発現させ、全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)を調製して Proteinase K 処理後にイムノブロット法を行った。短期間の継代後に調製した WCL は酵素処理で PrP が消失したが、長期間継代後の WCL では N 末端だけが消化された酵素処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP<sup>Res</sup>)が検出された。以上の結果から、T98G 細胞は PrP<sup>Sc</sup> の正常細胞への伝達機構及び正常 PrP が PrP<sup>Sc</sup> に変化する機構の解明に有用な細胞株と考えられる。

A. 研究目的

本研究では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(PrP<sup>Sc</sup>)汚染の簡便、迅速で高感度なインビトロ検査法の開発を目的とし、次の項目について検討した。

1. マウス抗組換えウシ・プリオン蛋白質ポリクローナル抗体の調製
2. PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞の候補を検索し、プリオン蛋白質(PrP)の発現機構を解析

B. 研究方法

1. マウス抗組換えウシ・プリオン蛋白質ポリクローナル抗体の調製  
ウシ PrP のアミノ酸配列 25-241 残基に相当する組換え蛋白質(rBoPrP)を調製し、100 匹の BALB/c マウスを免疫して抗血清を得た。固相抗原として rBoPrP 及びウシ PrP のアミノ酸配列 153-171 残基に相当するペプチド bPrP (153-171)を用いた ELISA で、抗体の反応性を調べた。
2. イムノブロット法  
ヒト・グリオマ細胞株 T98G を培養後、全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)を調製して糖鎖切断酵素(PNGase F)で正常プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)の糖鎖を切断し、SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜へ転写した。マウス抗ヒト・プリオンペプチド・モノクローナル抗体 6H4 を用いたイムノブロット法を行い、化学発光法で PrP<sup>C</sup> を検出した。
3. 蛋白質分解酵素消化  
T98G 細胞の WCL を 37°C で Proteinase K 消化し、6H4 及びニワトリ抗ヒト・プリオンペプチド・モノクローナル抗体 HUC 2-13 を用いたイムノブロット法で PrP の蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

C. 研究結果

1. 抗 PrP ポリクローナル抗体の調製

rBoPrP でマウスを免疫し、ELISA とイムノブロット法で rBoPrP と BoPrP<sup>C</sup> を認識する抗血清を得た。この抗血清は、ウシとヒトのプリオン蛋白質(PrP)で共通なアミノ酸配列(ウシ 153-171 残基とヒト 142-160 残基)に相当するペプチドを固相抗原とした ELISA で反応性を示した(Fig. 1)。

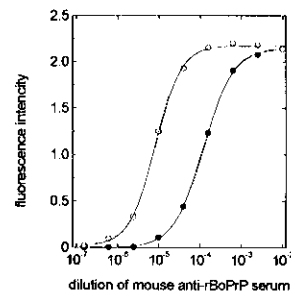


Fig. 1. Binding of mouse anti-rBoPrP serum to coating antigen in ELISA. Various concentration of mouse anti-rBoPrP serum were incubated with rBoPrP (○) or bPrP (153-171)-Cys-OVA (●) as coating antigen.

2. PrP<sup>C</sup> 高産生細胞の検索

生体内で産生された PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>Sc</sup> に変換されることから、PrP<sup>Sc</sup> 易感染細胞の候補として PrP<sup>C</sup> 高産生細胞を検索した。各種培養細胞の WCL を調製し、イムノブロット法で PrP<sup>C</sup> 含量を調べたところ、ヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G が



PrP<sup>C</sup>を高発現しており、その産生は休止期(G1)に高くなった。

### 3. 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質の産生

PrP<sup>Sc</sup>は蛋白質分解酵素抵抗性を示すことから、T98G細胞を用いてPrP<sup>res</sup>の発現機構を調べた。

細胞を長期間の継代後に播種して長期間培養し、調製したWCLを各濃度のProteinase Kで消化後(37°C、60分間)、イムノブロット法を行った(Fig. 2)。ヒトPrPの中間部位を認識する6H4は、酵素未処理のWCLで38 kDa、31 kDa及び25 kDaにPrPに相当するバンドを示したが(Fig. 2-A, lane 4)、10 µg/mlで酵素処理したWCLでは38 kDaのバンドが消失し、31 kDaのバンドが増大した(Fig. 2-A, lane 3)。一方、ヒトPrPのN末端を認識するHUC 2-13は、酵素未処理のWCLで6H4と同様なバンドを示したが(Fig. 2-B, lane 4)、酵素処理では全てのPrPが消化された(Fig. 2-B, lane 1-3)。

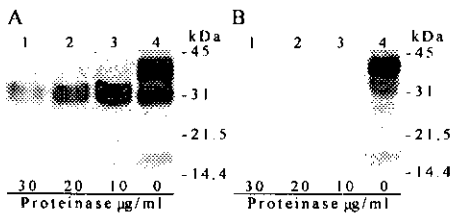


Fig. 2. PrP in long term-incubated T98G cells are Proteinase K resistant. Fifty µg of whole cell lysates were treated with Proteinase K. After incubation for 60 min at 37°C, the lysates were subjected to immunoblot with 6H4 (A) or HUC 2-12 (B) antibody as described.

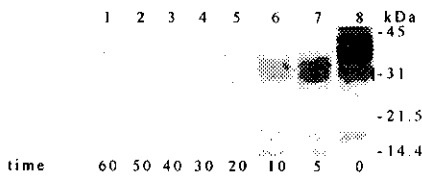


Fig. 3. PrP in short term-incubated T98G cells are partially Proteinase K resistant. Fifty µg of whole cell lysates were treated with Proteinase K (10 µg/ml). After incubation at 37°C, the lysates were subjected to immunoblot with 6H4 antibody as described. The lysates were prepared from T98G cells at relatively low-population doubling level.

また、細胞を短期間の継代後に播種して長期間培養し、調製したWCLをProteinase Kで消化後(37°C、10 µg/ml)、6H4を用いてイムノブロット法を行った(Fig. 3)。5-10分間の酵素処理では僅かに31 kDaのPrPに相当するバンドを示したが(Fig. 3,

lane 6-7)、20-60分間の酵素処理では全てのPrPが消化された(Fig. 3, lane 1-5)。

### D. 考察

医薬品及び医療用具等のPrP<sup>Sc</sup>の汚染を防ぐために、勘弁、迅速で高感度なPrPの検出法を確立する必要がある。現在、PrP<sup>Sc</sup>の検出法には試料を動物の脳内に接種してプリオン病の発症を病理組織における空胞変性やPrP<sup>Sc</sup>の蓄積等を指標に調べるバイオアッセイと、PrPを認識する抗体を用いたイムノアッセイが用いられている。バイオアッセイは高感度な検出法だが、判定までに数か月から3年程度の期間が必要である。一方、イムノアッセイはバイオアッセイに比べて簡便、迅速だが、その検出感度はバイオアッセイの千分の1程度にしか過ぎない。

本研究では簡便、迅速で高感度な異常プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法として、PrP<sup>Sc</sup>易伝達性培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発を目的とし、ウシとヒトのPrPを認識するマウス抗血清の調製およびヒト・グリオブラストーマ細胞株T98GのPrP産生機構の解析を行った。

調製したマウス抗血清は、ELISAでrBoPrPとウシ・プリオンペプチドbPrP(153-171)を認識した。ウシPrPの153-171残基のアミノ酸配列はヒトPrPの142-160残基と同じことから、この抗血清はヒトPrPを認識する抗体を含むと推定され、ヒト由来培養細胞株の免疫染色やWCLの免疫沈降に利用可能と考えられる。

ヒト・グリオーマ細胞株T98GのWCLに、イムノブロット法でPrP<sup>C</sup>を検出した。PrP<sup>C</sup>は対数増殖期では産生量が低く、定常期では増加した。また、対数増殖期の細胞を血清非存在下で休止期に誘導するとPrP産生量が増えることから、PrPの発現はG1期に増大すると推定した。

長期間の継代後に播種したT98G細胞は、6H4が認識するProteinase K消化に抵抗性のPrP<sup>res</sup>を産生した。T98G細胞が産生したPrP<sup>res</sup>は20-50 µg/mlのProteinase K処理では消化され、10 µg/mlのProteinase Kに抵抗性を示した。PrP<sup>Sc</sup>のN末端は酵素消化されるがC末端側は抵抗性を示し、本研究でイムノブロット法に用いた6H4はヒトPrPの中間部位(144-152残基)を、HUC 2-13はシグナルペプチドが切断されたN末端(25-49残基)を認識することから、T98G細胞が長期間継代後に産生するPrPの酵素処理抵抗性もPrP<sup>Sc</sup>と同様と判断した。

一方、短期間の継代後に播種した細胞のWCLは60分間のProteinase K処理ではPrPが消化され、その抵抗性は5-10分間の消化に抵抗性を示す部分的なものだった。一般に、遺伝型CJDの患者由来のPrP<sup>Sc</sup>は1-10 µg/mlの、散發型CJDやBSEは20-50 µg/mlのProteinase K処理に抵抗性を示す。T98G細胞が発現したmRNAの塩基配列は、PrP遺伝子(AY008282)の塩基配列と一致し、現在知ら

れている遺伝型 CJD に相当する変異はなかった。現在、ゲノム DNA の PrP 遺伝子の解析を進めている。

長期間継代後の T98G 細胞が PrP<sup>Sc</sup> と同様な酵素処理抵抗性を有する PrP を産生したことから、次年度は詳細な PrP の発現機構の解明を行い、PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞への適用を試みる予定である。

#### E. 結論

平成 13 年度は、ウシとヒトで共通なアミノ酸配列部位を認識する抗体を含むマウス抗組換えウシ・プリオン蛋白質抗血清を調製した。また、T98G 細胞を G1 期に誘導すると PrP<sup>C</sup> 産生量が増大すること、長期間の継代後に播種すると Proteinase K 消化に抵抗性の PrP<sup>res</sup> を産生することを見いだした。次年度は、T98G 細胞の PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞としての適用を試みる予定である。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

1. 武木田薫, 谷村顕雄, 菊池裕, 山崎壮, 高鳥浩介, 棚元憲一, 品川森一, 澤田純一: 抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用いた食品中のプリオンタンパク質検出法の開発 日本食品衛生学会第 82 回学術講演会、2001 年 10 月、長崎

##### 論文

1. Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.*, 48: 2002 (in press)
2. 武木田薫, 菊池裕, 山崎壮, 掛谷知志, 高鳥浩介, 棚元憲一, 澤田純一, 谷村顕雄: 競合的 ELISA による食品試料中のプリオン蛋白質検出に関する検討、*食品衛生学雑誌*, 43: 2002 (in press)
3. Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: G<sub>1</sub>-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 2002 (in press)

#### G. 協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 掛谷知志(リサーチ・レジデント)

## 抗プリオン蛋白質抗体パネルの作製

分担研究者： 堀内 基広（帯広畜産大・原虫研、獣医公衆衛生）

### 〔研究要旨〕

プリオン病の病原体(プリオン)の主要構成要素は正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)の病原性構造異性体である異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)である。プリオン病の診断、予防、治療法の開発には本病の病態機序の解析が必要である。本研究ではプリオン病の高感度診断法の開発をはじめ、プリオン病の研究に広く応用可能な PrP 分子に対するモノクローナル抗体パネルの作製を試みた。PrP 遺伝子欠損マウスに 1)スクレイピー感染マウス脳から精製した感染性を有する PrP<sup>Sc</sup>、2)大腸菌で発現させた組み換えマウス PrP(rMoPrP)を免疫して、常法に従って mAb を作製した。計 34 の mAb 樹立し、その性状を詳細に解析した。mAb は認識するエピトープから大きく 9 群に分類できた。このうち 8 群は PrP<sup>C</sup> と変性 PrP<sup>Sc</sup> に反応する pan-PrP 抗体に属する。Pan-PrP 抗体のうち 6 群は PrP 分子上の aa59-89(I), aa119-127(II), aa137-145(III), aa143-153(IV), aa161-169(V), aa219-229(VI)のリニアエピトープを認識し、残りの 2 群は aa155-231(VII)、aa89-231(VIII)から構成される構造エピトープを認識した。このように PrP 分子上の異なる 8 箇所のエピトープを認識する mAb パネルが作製できた。また rMoPrP とは反応しないが精製 PrP<sup>Sc</sup> と反応する抗体(IX)が 1 クローン得られた。PrP<sup>Sc</sup> を変性剤で処理するとこの抗体は反応しなくなることから、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な抗体である可能性が示唆された。

### 〔研究目的〕

プリオンの主要構成要素は異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)であり、PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することがプリオンにおける神経細胞死に関与すると考えられている。従って PrP<sup>Sc</sup> および PrP<sup>Sc</sup> 生成の基質となる正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)の諸性状や生成・分解機構の解析は、依然不明な点が多いプリオンの本体の解明、および本病の診断・予防・治療法の開発に必要な基礎知見を得るという観点から重要な研究対象である。PrP 分子の性状解析には認識するエピトープなど性状が明確なモノクローナル抗体(mAb)パネルは非常に有用な道具である。また、現行法よりも精度・感度が高いプリオン病診断法の開発にも、PrP 分子に対する抗体パネルは必要と考えられる。そこで本研究では、プリオン病研究全般に利用できる mAb パネルを作

製することを目的として、PrP 分子に対する mAb を多数作製して、その性状を詳細に解析した。また、作製した抗体パネルの中から、2001 年 10 月に開始された BSE スクリーニング検査の確定検査に使用する抗体の選別と供給体制の確立を行った。

### 〔研究方法〕

マウススクレイピー帯広株感染マウス脳から PrP<sup>Sc</sup> を精製した。組換えマウス PrP(rMoPrP)は原核細胞発現ベクター pRSETB および pET22b にて大腸菌で発現させた。封入体を GdnHCl あるいは Urea で変性後、DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィおよび逆相 HPLC により、分子内 SS 結合を形成した rMoPrP を精製した。精製 PrP<sup>Sc</sup> あるいは精製 rMoPrP を PrP 遺伝子欠損マウスに免疫

し、常法に従い細胞融合を行った。ハイブリドーマの培養上清は精製 PrP<sup>Sc</sup> および rMoPrP を抗原とした ELISA によりスクリーニングした。抗体が認識するエピトープの解析は欠損変異および点変異 rMoPrP を用いて ELISA により行った。Pepspot 膜もエピトープの解析に使用した。抗体が認識する PrP の種特異性はマウス、ハムスター、牛、羊の組み換え PrP、およびスクレイピー感染マウス、羊、および BSE 牛から調製した PrP<sup>Sc</sup> を使用して、ELISA およびウエスタンブロット (WB)法にて解析した。蛍光抗体法により mAb が認識する PrP の細胞内局在を調べた。

mAb は、ハイブリドーマの無血清高密度培養の上清から硫酸塩析およびゲルろ過により精製した。精製 mAb をペプシンにより消化して F(ab)<sub>2</sub> をゲル濾過にて分離した後に、2-メルカプトエチルアミンにて還元して Fab フラグメントを回収した。Fab フラグメントは BMCC-biotin によりビオチン化した。また、GMBS を介して西洋ワサビペルオキシダーゼを標識した。

(倫理面への配慮)

研究に用いた動物の飼育管理は帯広畜産大学動物実験指針を遵守して行った。

[研究結果]

エピトープ解析の結果から、樹立した mAb は少なくとも 9 群に分類可能であった (表 1)。グループ I から VI に分類した mAb は pepspot 膜による解析から、aa59-89(I), aa119-127(II), aa137-145(III), aa143-153(IV), aa161-169(V), aa219-229(VI) のリニアエピトープを認識することが明らかとなった。グループ VII および VIII に分類した抗体は変異 rMoPrP を用いた ELISA により aa155-231(VII)、および aa89-121(VIII) の領域から構成される非連続エピトープを認識することが判明した。また、VII および VIII 群に分類した mAb は分子内 SS 結合が形成されない C179A および C214A の変異組換えハムスター PrP と反

応しなかったことから、これらの非連続エピトープ形成には PrP 分子内の SS 結合が関与していると考えられる。グループ I から VIII の mAb は ELISA において rMoPrP とは反応するが、PK 処理した未変性 PrP<sup>Sc</sup> と反応しないかもしくは非常に弱い反応性を示すのみであった。しかし、3M GdnSCN で変性させた PrP<sup>Sc</sup> とは反応することから、グループ I から VIII の mAb は pan-PrP 抗体に属すると考えられる。I, IV, VII 群に属する mAb は IFA 細胞膜上に発現した PrP<sup>C</sup> を認識するが、V 群に属する抗体は ErR-golgi 領域に存在すると思われる PrP<sup>C</sup> を認識するが細胞膜上の PrP<sup>C</sup> とは反応しなかった。VI 群に属する抗体は N2a 神経芽細胞の核周囲あるいは、神経突起様に伸長した細胞質を繊維状に染色した。また、II, III 群に属する抗体は IFA では PrP<sup>C</sup> と反応しなかった。このように、認識するエピトープの違いにより細胞での染色パターンが明らかに異なることから、これらの mAb パネルは PrP<sup>C</sup> の構造と細胞内局在を解析するツールとなることが示唆される。

グループ IX に分類した抗体(mAb 6H10)は rMoPrP とは反応しないが PK 処理未変性 PrP<sup>Sc</sup> と反応するという、pan-PrP 抗体とは正反対の反応性を示したことから (表 1) mAb6H10 が PrP<sup>Sc</sup> と特異的に反応するが PrP<sup>C</sup> とは反応しない可能性が示唆された。

BSE スクリーニング検査の確定検査には開始当初から B103 ポリクローナル抗体が使用されてきたが、品質の安定性および安定供給から、将来的には mAb の使用が望まれる。そこで今回作製した抗体から、牛 PrP と反応する抗体を選抜し、ウエスタンブロットで BSE 牛由来 PrP<sup>Sc</sup> の検出感度を比較検討したところ、mAb44B1 (VII) > mAb72-5 (IV) = mAb43C5 (V) = B103 = mAb 6H4 (prionics 社) という結果が得られた。最も検出感度が高い mAb44B1 とバックグラウンドが非常に低い mAb43C5 の組み合わせを今後の確定検査 (ウエスタンブロット) で使用することで感度お

よび精度が向上するものと思われる。また、検査時間の短縮化を目的として、HRP 標識 Fab フラグメントを用いた直接法を検討したところ、Fab フラグメントにした場合は mAb72-5、mAb43C5 が mAb44B1 よりも若干優れていた (図 1)。免疫組織化学では mAb43C5 が B103 を含め他の抗 PrP 抗体よりも優れていた。

#### [考察]

PrP 分子上の 8 箇所の異なるエピトープを認識する pan-PrP 抗体パネルを作製した。認識するエピトープ領域から 8 群に分類したが、同じ群に分類した抗体の中にも性状が異なるものが含まれる。例えば I 群に分類した抗体は PrPN 末端側に存在する PHGGGWGQ の繰り返し配列を認識するが、抗体によって認識する配列が微妙に異なる。IV 群に分類した抗体は aa143-151 を認識するものと aa147-153 を認識する抗体に分けられる。今後さらに詳細な解析を行い、これらを異なる群に分類するべきかを判断する必要がある。また、IX 群に分類した mAb6H10 は PK 処理した未変性 PrP<sup>Sc</sup> とは反応するが、これを 3M GdnSCN で変性させると反応しなくなること、rMoPrP とは反応しないことから、pan-PrP 抗体とは明らかに異なる性状を示した。PrP<sup>Sc</sup> の構造エピトープを認識し、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な抗体である可能性が考えられる。

本研究で作製した抗体パネルを BSE スクリーニング確定検査に応用するために、BSE 牛由来の PrP<sup>Sc</sup> との反応性を、現在検査に用いられている B103 ポリクローナル抗体と比較したところ、ウエスタンブロット、免疫組織化学ともに、B103 よりも良好な反応性を示す抗体が見つかった。これらの抗体の精製標品は大量に調製済みであるので、今後確定検査に使用していく予定である。検査の短縮化を目的として、免疫染色を間接法と酵素標識抗体を用いる直接法の検出感度を比較したところ、直接法でも間接法と同等の感度を有

することが判明したので、酵素標識 Fab フラグメントの実用化も検討する予定である。

#### [結論]

PrP 遺伝子欠損マウスにスクレイピー感染マウス脳から精製した感染性を有する PrP<sup>Sc</sup> を免疫して、34 のモノクローナル抗体(mAb)を樹立した。作製した抗体は認識するエピトープから 9 群に分類可能であった。この mAb 抗体パネルはプリオン病診断法に関する応用研究から基礎研究まで様々な目的で使用可能である。

#### [研究発表]

##### 1. 論文発表

- 1) Horiuchi, M., Baron, G., Xiong, L.-W., and Caughey, B. Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.* 276: 15489-15497 (2001)
- 2) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63(9): 983-990 (2001)
- 3) 品川 森一、堀内 基広、松井 高峯 プリオンの免疫学的検出法 生活衛生、45: 259-269 (2001)
- 4) 池田 徹也、堀内 基広、古岡 秀文、石黒直隆、品川 森一 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 (2002)
- 5) 堀内 基広 動物のプリオン病 ウイルス、51(2): 145-150 (2002)

##### 2. 学会発表

- 1) Horiuchi, M.: Detection of PrP<sup>Sc</sup> for the diagnosis of prion diseases, *5th International Symposium on Infectious Disease*, Chunju/Korea (2001)
- 2) Horiuchi, M.: Inhibition of pathogenic prion protein formation; implication for possible

therapeutic target, *Forum for Infectious Disease of the 21th Century*, Osaka (2002)

3) 堀内 基広：動物プリオン病診断法の現状と課題、Brain 国際フォーラム 東京(2001)

4) 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 東京(2001)

5) 堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：PrP 合成ペプチドによる PrP 分子間相互作用の阻害、第 131 回日本獣医学会 東京(2001)

6) 毛利 崇、堀内 基広、石黒 直隆、品川森

一：免疫磁性ビーズを用いた PrP<sup>Sc</sup> 検出法の開発、第 49 回日本ウイルス学会 大阪(2001)

7) 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：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 大阪(2001)

8) 狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：精製 PrP<sup>Sc</sup> 画分と特異的に反応する mAb6H10 の解析、第 49 回日本ウイルス学会 大阪(2001)

表1. モノクローナル抗体の性状

MAb	Epitope	Clones	rPrP	PK(+) $\text{PrP}^{\text{Sc}}$		
				Denatured (GdnSCN)	Non- denatured	
I	56-89, L	6	+	+	-	細胞膜
II	119-127, L	1	+	+	-	陰性
III	137-145, L	2	+	+	-	ER-Golgi
IV	143-153, L	4	+	+	-	細胞膜
V	161-169, L	1	+	+	-	ER-goigi
VI	219-229, L	3	+	+	-	細胞質内繊維状
VII	155-231, D	12	+	+	-	細胞膜/陰性
VIII	89-231, D	4	+	+	-	細胞膜/陰性
IX	Unknown	1	-	-	+	NT

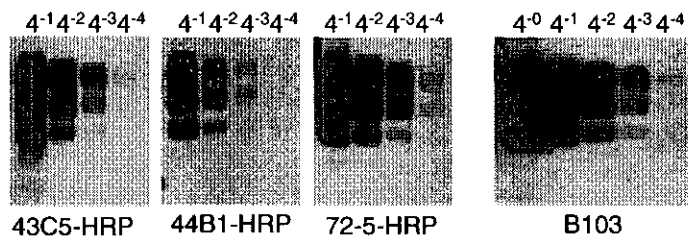


図1. 間接法と直接法による $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 検出感度の比較。

43C5-HRP, 44B1-HRP, 72-5-HRPはHRP標識Fabフラグメントを用いた直接法で検出した。B103は2次抗体にHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いた間接法で検出した。抗原としてBSE確定検査に使用しているマウス $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ (lot011209)を段階希釈して電気泳動したものを用いた。4<sup>0</sup>, 100 ug brain/lane; 4<sup>-1</sup>, 25 ug brain/lane; 4<sup>-2</sup>, 6.3 ug brain/lane; 4<sup>-3</sup>, 1.6 ug brain/lane; 4<sup>-4</sup>: 0.4 ug brain/lane.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Horiuchi, M., Baron, G., Xiong, L.-W., and Caughey, B.	Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain.	J. Biol. Chem.	276	15489 - 15497	2001
Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K.	Glycidol degrades scrapie mouse prion protein.	J. Vet. Med. Sci.	63	983 - 990	2001
品川森一、堀内基広、 松井高峯	プリオンの免疫学的検出法	生活衛生	45	259 - 269	2001
池田徹也、堀内基広、 古岡秀文、石黒直隆、 品川森一	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	2002
山崎壮	プリオン病を知るための情報ガイド	食品衛生学雑誌	43	J185 - J190	2002
Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.	Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting.	J. Health Sci.	48		2002 (in press)
武木田薫、菊池裕、 山崎壮、掛谷知志、 高鳥浩介、棚元憲一、 澤田純一、谷村顕雄	競合的 ELISA による食品試料中のプリオン蛋白質検出に関する検討	食品衛生学雑誌	43		2002 (in press)
Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.	G <sub>1</sub> -dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G.	Biol. Pharm. Bull.	25		2002 (in press)

(注) in press の刊行物は未添付



## 研究成果の刊行物・別刷

20010969

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。