

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（牛海綿状脳症研究分野）

プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の 感染・発症機構に関する研究班

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

（国立感染症研究所感染病理部）

肝炎等克服緊急対策研究事業（牛海綿状脳症研究分野）
 プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究班
 班員名簿

氏名	所属	職名
佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
堀内 基広	帯広畜産大学原虫病研究センター	助教授
松田 治男	広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室	教授
石黒 直隆	帯広畜産大学畜産学部獣医公衆衛生学教室	助教授
古岡 秀文	帯広畜産大学畜産学部病態獣医学講座	助教授
山河 芳夫	国立感染症研究所細胞化学部第一室	室長
森 清一	北海道畜産試験場畜産工学部	部長
三好 一郎	東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設	助手
松田 潤一郎	国立感染症研究所獣医科学部第四室	室長
寺尾 恵治	国立感染症研究所筑波霊長類センター	センター長
沢谷 広志	神奈川県食肉衛生検査所	所長

目 次

1. プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究
総括研究報告書（平成14年度）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

2. プリオン蛋白質の構造解析とプリオン感染の不活化・・・・・・・・・・・・ 5
分担研究者：堀内 基広（帯広畜産大学原虫病研究センター）

3. ニワトリを用いた抗プリオンモノクローナル抗体の作成と
その活用・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11
分担研究者：松田 治男（広島大学大学院生物圏科学研究科）

4. 動物プリオンタンパクの遺伝子解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
分担研究者：石黒 直隆（帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室）

5. 牛海綿状脳症の病理診断に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

6. 動物プリオン病の病理学的診断に関する研究・・・・・・・・・・・・ 25
分担研究者：古岡 秀文（帯広畜産大学病態獣医学講座）

7. 異常型プリオンタンパク質の生化学的検出・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
分担研究者：山河 芳夫（国立感染症研究所細胞化学部）

8. 疑似患畜を用いた発症前のプリオン動態・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
分担研究者：森 清一（北海道立畜産試験場畜産工学部）

9. キメラ型プリオンタンパク遺伝子導入によるプリオン感受性マウスの開発に関する研究	35
分担研究者：三好 一郎（東北大学大学院医学系研究科）	
10. 高感度バイオアッセイ系の開発	39
分担研究者：松田潤一郎（国立感染症研究所獣医科学部）	
11. カニクイザルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発	42
分担研究者：寺尾 恵治（国立感染症研究所筑波霊長類センター）	
12. 食肉の神経組織による汚染防止に関する研究	47
分担研究者：沢谷 広志（神奈川県食肉衛生検査所）	

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

1. プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究

主任研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究要旨 本研究班では、(1)プリオンの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品等のプリオン汚染評価方法の検討やプリオン不活化法および検証方法の開発等、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行うことを目的とした。わが国にはプリオン研究者は少ないので共同研究が必要となり、またウシ遺伝子改変マウスやBSE ウシ検体そして霊長類を用いた感染実験材料は研究班内の共通研究資源とし、それぞれの実験研究に役立てることで研究を加速していく。また研究期間中に得られた結果をもとに班員相互の協力体制をとり効率よく研究が進むようにすることも考えている。本年度は短期間であったが予想以上の結果が得られたので、来年度の成果が期待できる。

分担研究者（10名）

古岡 秀文 帯広畜産大学畜産学部獣医学科病態獣医学講座・助教授
堀内 基広 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教授
石黒 直隆 帯広畜産大学畜産学部獣医学科獣医公衆衛生学教室・助教授
松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室・教授
山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部・室長
三好 一郎 東北大学大学院医学研究科付属動物実験施設・助手
松田純一郎 国立感染症研究所獣医科学部・室長
森 清一 北海道畜産試験場畜産工学部・部長
寺尾 恵治 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター・センター長
沢谷 広志 神奈川県食肉衛生検査所・所長

(vCJD)はわが国では発見されていないが、英国等世界で138例見つかり、食品分野のみならずBSE等のプリオン感染症対策は緊急的重要課題である。

本研究では、(1)プリオンの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品等のプリオン汚染評価方法の検討やプリオン不活化法および検証方法の開発等、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行う。そのためには、正常型および異常型プリオン蛋白質の相違とプリオンの動物体内増殖機構、プリオン病に対する感受性、そして発症機構を明らかにするため、基礎および応用面から共同して総合的に研究を行う。これらを通して、プリオンの免疫化学的、病理学的およびバイオアッセイによる検査法、プリオン不活化法等、食品分野における牛海綿状脳症対策に役立つ具体的方法を開発し、わが国の食品の安全性を向上させ、変異型クロイツフェルドヤコブ病の発生対策に資することを目的とする。

A. 研究目的

平成13年9月に日本ではじめて牛海綿状脳症(BSE)例が発見され、食肉の安全性を図るために食肉衛生検査所で全頭検査が始まり新しい例も見つかった。BSEが原因と考えられるヒトの変異型クロイツフェルドヤコブ病

B. 研究方法

3年間の全体計画は下記の通り3本の柱を立て実施する。研究期間中に得られた結果をもとに班員相互の協力体制をとり効率よく研究が進むようにする。BSE プリオンはバイオセーフティレベル2の病原体であり、実験としてその増殖を動物で行うことが多く、その場合はレベル3になる。各研究者の所属する施設でプリオンを取り扱うレベル3相当の実験室は整備されていない場合もあるので、共同研究が必要となるからである。またウシ遺伝子改変マウスや BSE ウシ検体、そして霊長類を用いた感染実験材料は研究班内の共通研究資源とし、それぞれの実験研究に役立てることで研究を加速する。既知のごとく、プリオンの感染性や伝達性の最終評価はマウス等の実験動物を必要とする。種のバリアーがあるため実験動物の発症には通常1年以上の潜伏期間を要する。したがって本研究の最終評価には研究期間の3年を超える可能性も考えられるが、結果を着実に積み上げていきたい。

本年度は3年計画の初年度であるが、実質的に10月からスタートしたので、それぞれの研究・開発の準備期間と位置づけられる一方、これまでプリオン病研究に取り組んで来られた研究者には BSE の視点をはずさないような研究をお願いした。

以下は本研究班の3つの柱と課題および担当者である。

1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発には、プリオン蛋白質の構造変化の解析(堀内)、プリオン特異抗体の開発と検討(松田(治))、検出方法の検討(佐多)、プリオン蛋白質の拮抗的検出・定量法の開発(山河)を行い、また検討材料としてのプリオンは感染牛由来および遺伝子改変マウスで作製しプリオン株として供給する(松田(潤)、三好)。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明については3年を超える時間を要することが予想されるが、従来のプリオン検査法とともに、遺伝子改変マウス(三好)によるバイオアッセ

イ系の開発(松田(潤))、マウスやサル等の実験動物モデルの作製(寺尾)と解析(古岡、佐多)、感染牛での検討(森、古岡)、プリオン感受性解析を目的とした PrP 遺伝子型の検討(石黒)、そしてプリオン病病態解析を目的としたプロテオーム解析によりマーカー蛋白質の検索・同定(山河)により行う。

3) 食品の安全性を図るために食肉の処理方法の検討や前述した検査や病態解析結果を食品分野で検証し応用するに食肉衛生検査所における実際的な検討が不可欠であり、全国食肉衛生検査所協議会の会員に協力を求め、これらを総合的に用いて有効な食肉汚染防止法を開発する(沢谷)。

(倫理面への配慮)

動物実験は各施設の動物実験委員会の承認をえて、動物実験指針にもとづいて行う。「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、実験動物の使用を最小限にするとともに、取り扱いや処理には動物愛護の精神を持って臨む。またプリオンの扱いは、国立感染症研究所におけるバイオセイフティー安全管理規定を遵守し、国際的な基準にも十分に配慮する。

C. 研究結果

1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発

PrP分子の構造および性状解析を目的としてエピトープの異なる10種類のモノクローナル抗体を使い、スクレイピーマウス脳精製 PrP^{Sc} や N2A マウス神経芽腫細胞を用いて解析した。Proteinase K 処理後の PrP^{Sc} とは反応しなかったがグアニジン変性では反応がみられたので、これらのエピトープは PrP^{Sc} 凝集体分子上に抗体が結合できる形では存在していないことが判明した。また細胞膜上の成熟型に反応する抗体がある一方で細胞内の未熟型のみと反応するものがあつた(堀内)。プリオン検出に実用的レベルで利用可能なニワトリの抗プリオンモノクローナル抗体のパネル化を進めかつ組

換え型ニワトリモノクローナル抗体の精製が可能となった（松田治）。ウシプリオンの高感度バイオアッセイ系として、あるいはプリオン病発症機構の解明に使えるウシプリオン遺伝子改変マウスの作製を開始し、ファウンダー3匹を作出し、うち1系統で脳でのプリオン遺伝子の mRNA を確認した（松田潤）。BSE 確認検査のうち病理・免疫組織化学法を確立しマニュアル化した（佐多、古岡）。またウエスタンブロット法についても同様に確立した（堀内、山河）。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明

BSE 全頭検査による摘発ウシの延髄組織について神経核と PrP^{Sc} の分布を検討し、BSE の初期では迷走神経背側核が強く侵されついで知覚核や中継路核に広がり、運動核は軽度であることが明らかとなった（古岡）。BSE 陽性ウシの全身組織採材が可能であった2例について PrP^{Sc} の分布を病理免疫組織化学的に検討し、神奈川例では大脳基底核、皮質、小脳、脊髄、回腸末端部、神経節に、和歌山例では大脳、小脳、脊髄にプリオンが検出された（佐多）。同様にウエスタンブロット法で神奈川例について検討したところ、大脳、小脳、脊髄、回腸遠位部、神経節みられ、これらの相対的沈着量を明らかにした。また延髄組織では検査に使用した門部分に強くみられ、ほかの部位ではほとんど認められなかった（山河）。ヒツジや山羊そしてウシの PrP 遺伝子多型について検討したところ、ヒツジでは171番アルギニンをもつ個体が41/117頭、ヤギでは7カ所に変異が観察された。ウシでは6回のオクタリピートが大部分であったが5頭に5回のリピート例があり、また288塩基欠失例もみつかった（石黒）。ウシあるいはヒツジ/マウスキメラ型 PrP^C 遺伝子を導入した遺伝子改変マウスをウシ型3系統、ヒツジ型4系統を構築し、スクレイピープリオン陽性1%脳乳剤を接種したところ、わずかな感受性増加がみられる場合もあったが、期待に反し潜伏期間は延長し発症率も低下した（三好）。カニクイサルを用いた BSE プリオン感染モデルの作製により変異型 CJD の病態解明お

よび早期診断法を開発すること、および経時的に採取した血液、髄液、および主要組織を研究班の研究資源化にすることを目的として実験設備整備と実験準備を行った。とくに行動や神経機能解析のために指迷路装置を用いて学習能力を評価し80%以上の正答率をえた（寺尾）。BSE 疑似患者18頭について定期的に臨床症状、血液、髄液、尿を採取し検討をおこなった。飼育中に3頭が別の原因で死亡したがプリオンは認めなかった。また現在まで異常な症状や検査所見を示した例はなかった（森）。

3) 食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発

と畜時の脳・脊髄組織による食肉等への汚染防止法の開発を目的とし、と畜時のスタンピングとピッシング操作と血液への神経組織汚染の関連について全国9カ所の食肉衛生検査所で検討した。ピッシングやスタンピングによる血液への神経組織の混入について統計学的な有意差が得られなかったが、心残血に高い傾向が認められた。血液や食肉中へのスパイク試験では十分な測定結果が得られた。またと畜方法による問題点が指摘できた（沢谷）。

D. 考 察

抗プリオン抗体のパネルを用いた検討では、今後プリオン感染性消失とプリオンの構造変化を詳細に解析することが可能となると考えられ、また細胞に発現するプリオンの染色パターンが異なることから生合成過程においてプリオン構造が変化しうることおよび細胞小器官特徴的な分子種の存在が示唆された。このパネルは、ニワトリのモノクローナル抗体とともに、プリオン構造の解析にも有用であるのみならず、検査法への応用も可能となると考えられる。

BSE 確認検査の病理免疫組織化学検査法やウエスタンブロット法の改良が行われ、その実際的な意義も BSE 陽性例の解析で明らかとなった。とくに、現在の延髄門部の迷走神経背側核を中心とする検査の根拠を与えるとともに、いろいろなバリエーションもあり得ることを示している。また特定部位の除去に根拠を与え

る結果が得られたことも重要である。これまで BSE ウシの検討は臨床症状を示したもので行われてきており、臨床症状の明らかでない初期の BSE 陽性ウシについて検討することは世界的にも例がなく、貴重なデータが得られていくと考えられる。今後は副交感神経系を中心とするより詳細な解析を積極的に進め、同時に種々の研究開発の研究資源としていきたい。

高感度バイオアッセイ系の開発およびこれらを用いた発症機構の解析には遺伝子改変マウスの作製が待ち望まれている。世界的にもごくわずかしかな存在しないので、開発が進んでいることは成果と見なせる。また先に作製した遺伝子改変マウスの実験結果からも有用なマウスの開発が望まれる。疑似患者での検討は困難が予想されるがウシ飼育に関し動物愛護上の問題をほぼクリアした限られた施設であるので今後に期待したい。またサルへの感染実験の準備が整ったので国内 BSE 陽性ウシ検体を用いた実験開始が行えるようになった。

と畜時における大脳や脊髄神経組織の汚染防止法の開発は一方で重要な問題である。今回の多施設での検討方法の確立とその結果や問題点の把握により新しい安全なと畜法の開発につながっていくものと期待される。

E. 結 論

研究開始からの期間が短いにもかかわらず予想以上の結果が得られ、進捗状況は良好であると考えられた。今後は班員間の協力体制を明らかにし研究促進につなげていく。

F. 健康危険情報

とくにない。

G. 研究発表

1. 論文発表

省略（各分担研究報告書参照）。

2. 学会発表

省略（各分担研究報告書参照）。

II. 分担研究報告書

2. プリオン蛋白質の構造解析とプリオン感染の不活化

分担研究者 堀内基広 帯広畜産大学原虫病研究センター助教授

研究要旨 組換えプリオン蛋白質(rPrP)の NMR 構造が明らかとなっているが、細胞膜上に発現する成熟型 PrP(PrP^C)および異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の構造は不明な点が多い。そこで、PrP 分子の構造およびさらなる性状解析を目的として、我々がこれまでに作製してきた抗 PrP モノクローナル抗体(mAb)パネルを用いて、PrP 分子ドメインの解析を行なった。解析にはマウス PrP コドン 56-90、119-127、137-145、143-151、147-153、163-169、219-229 の連続エピトープを認識する抗体、および 155-231、89-231 内に存在する非連続エピトープを認識する抗体を用いた。これらの抗体は、Proteinase K 処理した精製 PrP^{Sc}とは反応しなかったが、精製 PrP^{Sc}を GdnSCN で変性させると反応した。従って、これらのエピトープは PrP^{Sc}凝集体の分子上には抗体が結合できる形では存在していないことが示唆された。間接蛍光抗体法とフローサイトメトリーにより神経芽細胞に発現する PrP^Cを調べた結果、マウス PrP コドン 56-89、143-151 の連続エピトープを認識する抗体、および 155-231、89-231 内に存在する非連続エピトープを認識する抗体は細胞膜上に発現する成熟型 PrP^Cと反応したが、それ以外の抗体は成熟型 PrP^Cとは殆ど反応しなかった。しかし、ER あるいはゴルジ装置などに局在する PrP^Cとは反応した。従って PrP^Cの成熟過程で PrP^Cが幾つかの構造をとるものと考えられる。以上の結果は我々の抗 PrPmAb パネルが PrP の構造を解析するための有用な道具であることを示すものである。

A. 研究目的

異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})がプリオン病の病原体“プリオン”の主要構成要素と考えられている。PrP^{Sc}は宿主遺伝子にコードされる正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の構造異性体である。両 PrP は生化学的に区別可能であるが、構造など依然不明な点が多くこのさされている。これまでに、NMR 解析による組換えプリオン蛋白質(rPrP)、クライオ電顕による解析から PrP^{Sc}の構造がモデルが報告されている。PrP^Cの構造は rPrP 類似すると思われる。抗体の結合性などの情報は、1)rPrP の構造から生理条件下における PrP^Cの構造をモデル化、2) PrP^{Sc}のドメイン単位の構造予測、に重要な知見となる。

我々はこれまでに、多数の抗 PrP モノクローナル抗体(mAb)を作製してきた。この抗 PrPmAb パネルは、少なくとも 7 種の連続エピトープ、3 種の非連続エピトープを認識する mAb から構成される。そこで、PrP 分子の構造に関する

知見を得ることを目的として、この mAb パネルを用いて、培養細胞で発現する PrP^Cおよび PrP^{Sc}を解析した。

B. 研究方法

PrP^Cの解析には N2A マウス神経芽腫細胞を用いた。細胞をメタノール固定後、間接蛍光抗体法(IFA)を行なった。染色部位の細胞内局在を調べるために、ゴルジ装置のマーカーとして抗 Giantin 抗体、粗面小胞体(ER)のマーカーとして抗 Bip 抗体を用いて、二重染色を行なった。染色像は冷却 CCD カメラにて撮影した。N2A 細胞をコラゲナーゼで処理し、PBS 中に浮遊させた後に、抗 PrPmAb および FITC 標識抗マウス Ig で蛍光染色を行い、フローサイトメーターにより、細胞表面との反応性を調べた。

スクレイピー帯広株感染マウス脳から分別遠心法により PrP^{Sc}を精製した。精製マウス PrP^{Sc}を ELISA プレートに固相化し、ウエル内

で Proteinase K(PK)処理、および GdnSCN 処理を行なった。その後ウエルをブロッキングし、免疫染色を行なった。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会にて承認された実験指針に従って行なった。感染性を含む試料は帯広畜産大学 BSL2, 3 実験施設にて行なった。

C. 研究結果

精製 PrP^{Sc} に対する mAb パネルの反応性を図 1 に示した。使用した全ての抗体は PK 未処理精製 PrP^{Sc} と反応した。しかし、PrP^{Sc} を PK するとどの抗体も PrP^{Sc} と反応しなくなった。しかし PK 処理 PrP^{Sc} を 3M GdnSCN で変性させると、全ての抗体は再び反応した。処理も同様に作製して、BSE 感染牛脳乳剤に従って、PK 処理 PrP^{Sc} に用いた抗 PrPmAb パネルが反応しなかったのは、PK 処理により PrP^{Sc} が消化されたためではなく、パネル抗体が認識するエピトープ(表 1)は PrP^{Sc} 凝集体上では抗体がアクセスできるような状態で分子表面に存在していないことが示唆された。

PrP^C との図 2 に示した。aa56-90(mAb110)、aa143-151(mAb31C6)の連続エピトープを認識する抗体、および aa89-231(mAb72)、aa155-231(mAb)内に存在する非連続エピトープを認識する抗体は細胞膜上の PrP^C と反応したが、それ以外の mAb は細胞膜上の PrP^C との反応性は非常に弱かった。しかし、mAb132(aa119-127)を除く抗体はメタノール固定細胞を用いた IFA では細胞内に存在する PrP^C と反応することが判明した。mAb により染色される細胞内小器官が異なる傾向が認められたことから(図 3)、ゴルジ装置および ER マーカーとの二重染色を行なった(図 3)。その結果、mAb118 が染色する領域は主に ER マーカーである Bip と同様の局在を示し、mAb43C5 が染色する領域はゴルジ装置のマーカーである Giantin と重なることが判明した。

D. 考察

PK 処理 PrP^{Sc} に抗 PrPmAb パネルが反応しな

かった理由として、第一に、パネル抗体が認識するエピトープが PrP^{Sc} 凝集体表面に露出していないことが挙げられる。このことは、mAb パネルが PrP^{Sc} の構造解析に有用であることを示している。しかし、1)表面には存在するが抗体が結合できないような形に折りたたまれている、2)糖鎖などによる立体障害で結合できないこと、など他の可能性も考慮する必要がある。感染性を有する PrP^{Sc} 画分を 3M GdnSCN で完全に変性させると、プリオン感染性が消失することが知られているが、この抗体パネルを使用することにより、プリオン感染性消失と PrP^{Sc} の構造変化をより詳細に解析することが可能になると考えられる。

認識するエピトープにより細胞に発現する PrP^C の染色パターンが異なることは、PrP^C の生合成過程で PrP^C が複数の構造をとりうることを示唆している。特に ER およびゴルジ装置に局在した染色像は、それぞれの器官に特異的な PrP^C 分子種の存在を示唆しており、PrP^C 生合成過程を考える上で非常に興味深い。

E. 結論

PrP コドン 56-90, 119-127, 137-145, 143-151, 147-153, 163-169, 219-229 の連続エピトープを認識する抗体、および 155-231, 89-231 内に存在する非連続エピトープを認識する抗体からなる抗 PrPmAb パネルを用いて PrP^C および PrP^{Sc} の解析を行なった。これらの抗体は、Proteinase K 処理した精製 PrP^{Sc} とは反応しなかったが、精製 PrP^{Sc} を GdnSCN で変性させると反応した。従って、これらのエピトープは PrP^{Sc} 凝集体の分子上には抗体が結合できる形では存在していないことが示唆された。

マウス PrP コドン 56-89, 143-151 の連続エピトープを認識する抗体、および 155-231, 89-231 内に存在する非連続エピトープを認識する抗体は細胞膜上に発現する成熟型 PrP^C と反応したが、それ以外の抗体は成熟型 PrP^C とは殆ど反応しなかった。しかし、ER あるいはゴルジ装置などに局在する PrP^C とは反応した。従って PrP^C の成熟過程で PrP^C が幾つかの構造をとるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9): 3421-3426, (2002).
- 2) Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K. Tanimura, A., Tanamoto, K. and Sawada, J. Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Science*, 48(3): 288-291 (2002).
- 3) Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N., Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 65(1): 75-81 (2003).
- 4) 堀内基広(2002) プリオンの検出技術 臨床検査 46(12) 1545-1551.
- 5) 堀内基広(2002) プリオン蛋白質とプリオン病 栄養生理研究会報 46(1): 45-50.

2. 学会発表

- 1) 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、古岡秀文、木村久美子：モノクローナル抗体 6H10 の解析：PrP^{Sc} 特異的抗体の可能性 第 133 回日本獣医学会学術集会（東京）2002 年 4 月
- 2) 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^{Sc} 検出法の開発 第 133 回日本獣医学会学術集会（東京）2002 年 4 月
- 3) 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：抗 PrP モノクローナル抗体パネルの作製と抗体による PrP^{Sc} 産生阻害 第 133 回日本獣医学会学術集会（東京）2002 年 4 月
- 4) 堀内基広、石黒直隆、品川森一、古岡秀文、

北村延夫：経口ルートによるプリオンの感染成立には消化管リンパ装置の存在が必要である 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月

- 5) 工藤聡子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、横山 隆、梅谷 淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫生化学的 BSE 診断技術の感度・操作性の改良 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- 6) 田村勇耕、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一：尿崩症を誘発するマウス馴化スクレイピー株の分離 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

抗異常型プリオンモノクローナル抗体及びその製造方法並びにそれを用いた異常型プリオンタンパク質の免疫測定方法
発明者：品川森一、堀内基広、梅谷淳
出願人：帯広畜産大学学長、富士レビオ株式会社
特願 2002-129003

表1 抗PrPmAbのPrP^CおよびPrP^{Sc}に対する反応性

Group	epitope ^a		Reactivity to PrP ^{Sc} in ELISA ^b			Reactivity to cell surface PrP ^C
			PK(-)	PK(+)	PK(+)	
	position (amion acid)	L/DC	GdnHCl(-)	GdnHCl(-)	GdnHCl(+)	
I	56-90	L	+	-	+	+
II	119-127	L	+	-	+	-
III	137-145	L	+	-	+	-
IV	143-151	L	+	-	+	+
V	147-153	L	+	-	+	-
VI	163-169	L	+	-	+	-
VII	219-229	L	+	-	+	-
VIII	155-231	DC	+	-	+	+
IX	89-231	DC	+	-	+	+
X	89-231(143-153)	DC	+	-	+	+

^aL, linear epitope; DC, discontinuous epitope.

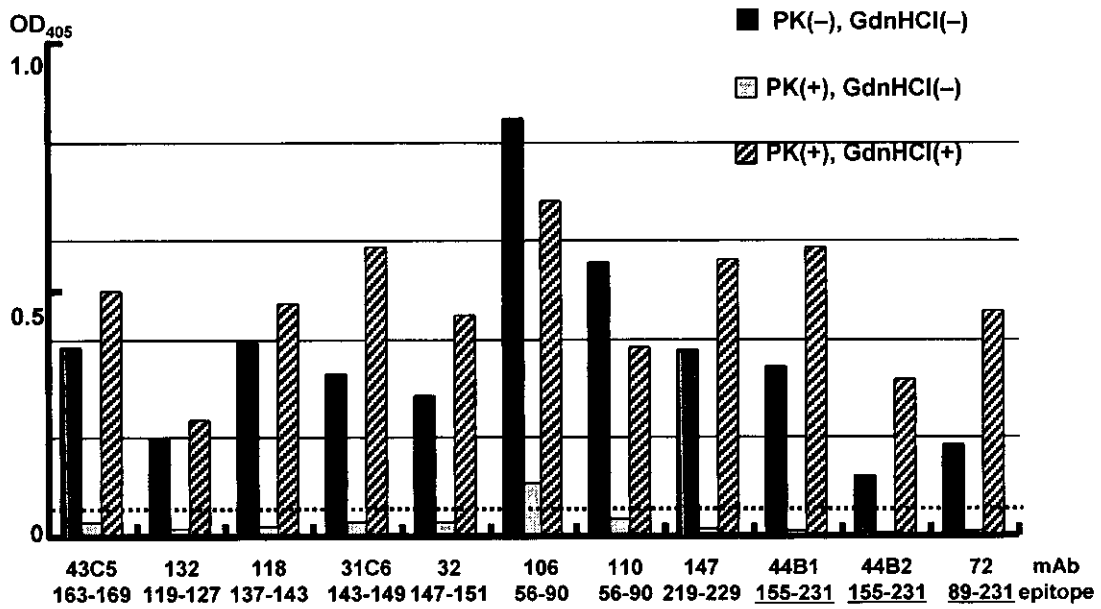


図1 精製PrP^{Sc}に対する抗PrPmAbの反応性

使用した抗体と認識するエピトープは下に示した。下線で示したエピトープは非連続エピトープ。

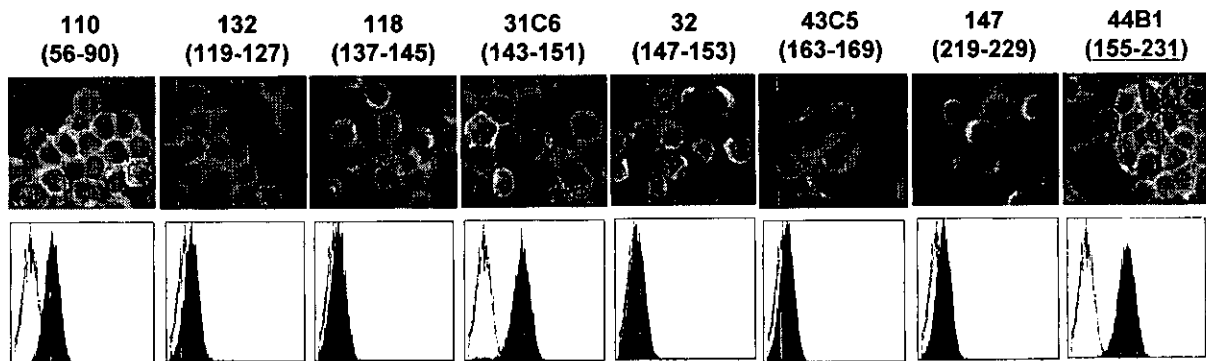


図2 N2Aマウス神経芽腫細胞におけるPrP^Cの発現

上のパネルはメタノール固定細胞を用いたIFA、下のパネルはフローサイトメーターによる細胞表面のPrP^Cとの反応性。使用した抗体は写真上に、認識するエピトープは括弧に示した。下線で示したエピトープは非連続エピトープ。

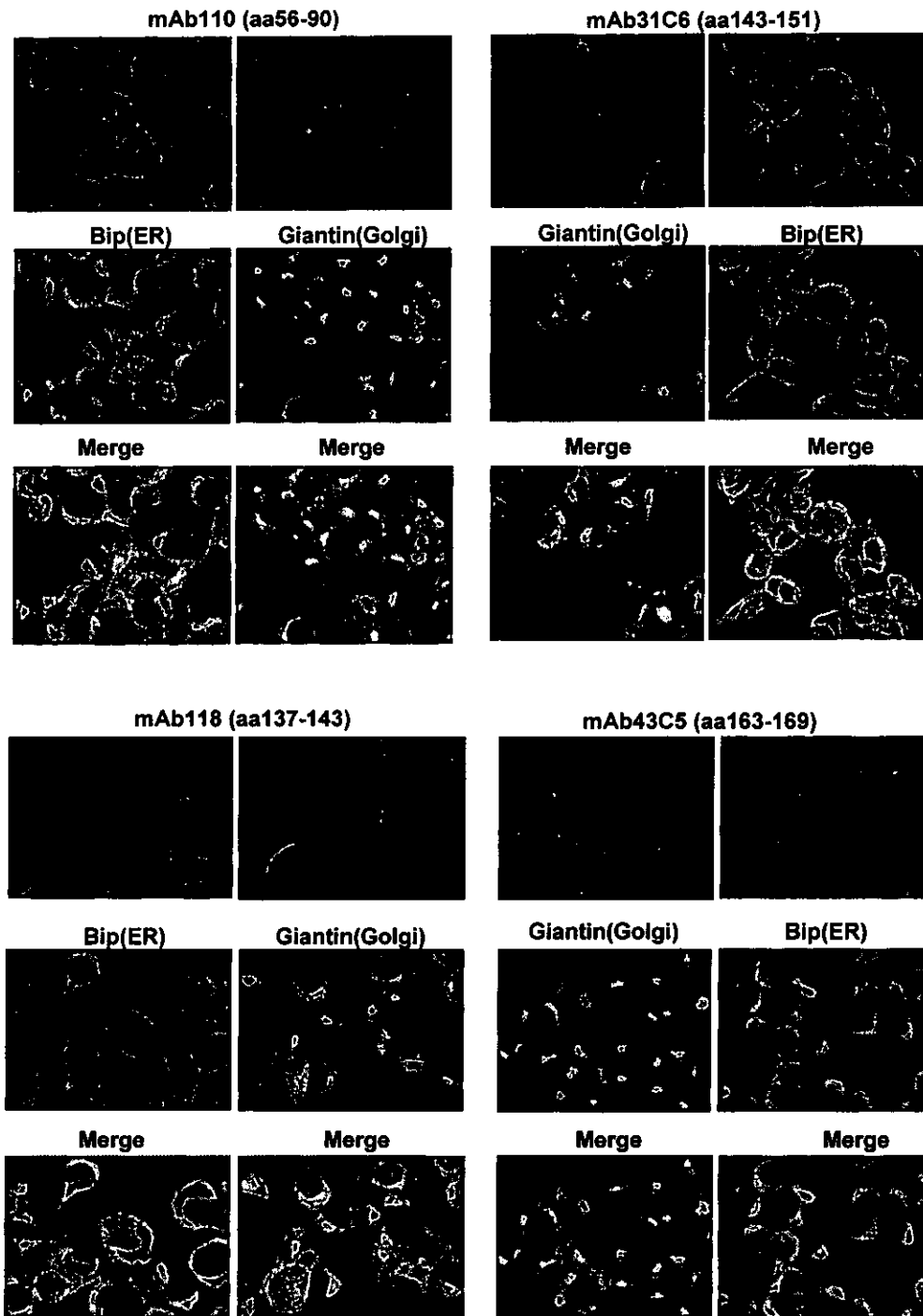


図3 N2Aマウス神経芽腫細胞におけるPrP^Cの細胞内局在

mAb110、mAb31C6、(細胞膜と反応するmAb)、mAb118、およびmAb43C5 (細胞膜と反応しないmAb) の結果を示した。PrPはAlexa488、Bip(ERマーカー) およびGiantin(ゴルジマーカー)はAlexa564標識二次抗体で検出した。

3. ニワトリを用いた抗プリオンモノクローナル抗体の作成とその活用

分担研究者 松田治男 広島大学大学院生物圏科学研究科教授

研究要旨 ほ乳動物プリオンタンパクを認識するニワトリモノクローナル抗体のパネル化を進めている。現状において、ほ乳動物プリオンタンパクを認識するニワトリモノクローナル抗体を大きく3グループに分類できている。組換え型のニワトリモノクローナル抗体の精製は、抗体発現ベクターを工夫することで容易となった。また、真核系発現が一部可能になったことは、今後の高感度プリオン検出系に組換え二価抗体を提供することになるだろう。さらに今後、抗体遺伝子ライブラリーから有用な抗体の樹立も可能なことから、有機的な研究展開で、実用化できる抗体群（パネル抗体）の構築が可能となるだろう。

A. 研究目的

ほ乳動物プリオンタンパクとニワトリプリオンタンパクの間には約40%の相同性しかない。この事実は、ほ乳動物プリオンタンパク特異的な抗体を作成する上で、ニワトリは有用な実験動物ということが言えよう。事実、本研究分担者らは、これまでに多種類の抗プリオンニワトリ抗体をモノクローナル抗体として開発してきた。本研究では、ニワトリを用いた抗プリオンモノクローナル抗体の作成について、従来法に加えニワトリ抗体遺伝子ライブラリーから探索し、それをもとに遺伝子工学的手法を用いて、プリオン病診断へ応用可能なニワトリ抗体の樹立、その大量生産および新たなプリオン検出法の開発を目指す。

B. 研究方法

これまでに作成した抗プリオンニワトリモノクローナル抗体をはじめプリオンタンパク免疫ニワトリの脾臓から調整・作成した抗プリオン抗体遺伝子ファージライブラリーから、有用抗体の選抜・作成を行う。また、組換え有用抗体を大量生産するための抗体精製法の開発を行う。さらに、将来的に高力値の抗体を安定生産するために、よりネイティブな二価組換え抗体の作成を行う。

なお本研究を通して、使用する実験動物（主

としてニワトリおよびマウス）の利用については、その倫理的配慮から使用数を最小限に留める等の注意を払った。

C. 研究結果

(1) 抗プリオンニワトリモノクローナル抗体のパネル抗体化

これまでに作成した抗プリオンニワトリモノクローナル抗体

本研究は、抗プリオンニワトリモノクローナル抗体をプリオン病診断に活用するための応用を意識した研究である。現在我が国のBSE検査体制は一次スクリーニングと二次検査（確定診断）の二段階システムをとっており、技術面では大きな問題が無いと考えられています。しかし、一次スクリーニングに使用されている国外製造の検査キットは高額であり、年間の経費は膨大であるばかりでなく、検査に携わる技術者の使用上の重圧等は大きいと聞く。

国内では、すでに複数のBSE検査法が開発中であり、これらの検査法が既知の検査法と比較して優れたものであれば、将来的に採用されうられると思われる。本研究では、ニワトリを用いて作成した抗プリオンモノクローナル抗体のパネル化を進め、有用抗体を選抜するとともに、その大量生産と有用抗体の二価組換え抗体化の作成も行い、新たな検査法に資することを目

的とした。

これまでに作成した抗プリオンニワトリモノクローナル抗体の総数は多く、認識エピトープ解析の終わっていない抗体を含めるとその総数は膨大である。一方、プリオンノックアウトマウスを用いた抗体作成に関わる私どもの研究や、他の研究グループの成果から判断されることは、より完ぺきな抗プリオンパネルモノクローナル抗体の作成には、ニワトリおよびプリオンノックアウトマウスを用いることであると想像される。なぜならば、プリオンノックアウトマウスを用いてさえ作成が難しい抗体がニワトリで可能であったり、そのまた逆のケースも存在するからである。

マウス抗体のヒト抗体化はすでに成功しているが、ニワトリ抗体のヒト抗体化が可能となってきた事実は、今後マウスやニワトリ抗体をより広範な活用へ応用することも期待されることにつながるものと思われる。

E. 結 論

抗プリオンニワトリモノクローナル抗体のパネル抗体化の進行が順調であり、同組換え抗体の精製による大量生産も可能となった。ニワトリ抗体の二価抗体化につての実験も順調に進んだ。今後、マウス抗体も含め研究班への提供も可能となることから、班研究への一層の協力体制構築に貢献したい。

F. 健康危険情報

特に問題となる危険はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuchi, Y., Kaneya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K and Sawada, J. G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. Biol. Pharm. Bull. 25(6): 728-733, 2002

その他、関連投稿中論文3編

2. 学会発表

1. 中村尚登、宮本和慶、堀内浩幸、古澤修一、松田治男： 新規発現ベクターを用いたニワトリ型リコンビナント抗体の作製. 第25日本分子生物学会、横浜、12.11-14、2002.
2. 川嶋 剛、中村尚登、丸山智 裕、堀内浩幸、古澤修一、松田治男： 遺伝子工学的手法を用いた抗プリオンタンパク質新規有用抗体の作製. 第25日本分子生物学会、横浜、12.11-14、2002.

4. 動物プリオンタンパクの遺伝子解析

分担研究者 石黒直隆 帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室助教授

研究要旨 羊と山羊のスクレイピーは、宿主の PrP 遺伝子のアミノ酸多型により感受性が異なる。本研究では日本で食されている羊や山羊の PrP 遺伝子のアミノ酸多型を解析した。また、牛の PrP 遺伝子のアミノ酸多型についても検討した。羊は 5 自治体からよせられた 117 頭を解析し、スクレイピーに高感受性の 136 番バリンは 1 頭と少なく、171 番アルギニン有する個体は 41 頭と多かった。山羊は 81 頭調査した結果、7 箇所のアミノ酸置換が観察された。その内、127 番セリン、146 番セリン、211 番グルタミンはこれまでに報告のないアミノ酸置換であった。全般的に、山羊は羊と同様に野生型が主流を占め、スクレイピーに感受性を示した。牛は 49 頭検査した結果、5 頭が 5 回のオクラリポートを有していた以外はすべて 6 回のリポートであった。また、1 頭の牛でヘテロであるが PrP 遺伝子が 288 塩基 (96 アミノ酸) 欠失していた。

A. 研究目的

羊や山羊のスクレイピーに代表される動物のプリオン病は宿主の PrP 遺伝子多型により、病気の発症が影響される。特に羊においては、これまでのところ多くの研究がなされてきており、136 番アラニンがバリンに置換すると、スクレイピーに対する感受性が高くなる。一方、171 番グルタミンがアルギニンに置換するとスクレイピーに対する感受性が低下して抵抗性を示す。山羊に関しては、国内の報告は未だないが、ヨーロッパの成績では 142 番イソロイシンからメチオニンへの置換、143 番ヒスチジンからアルギニンへの置換が、スクレイピーに対して抵抗性を示す。日本で食されている羊については、北海道で飼育されている羊群での成績があるが、全国的な規模での報告はない。また、山羊に関して羊同様に年間 6000 頭以上国内でと殺されているのに拘わらず、PrP 遺伝子のアミノ酸多型についての報告はない。本研究では、羊と山羊のスクレイピーサーベイランスで送られてきた検体を基に羊と山羊の PrP 遺伝子のアミノ酸多型を検討した。

一方、牛の PrP 遺伝子のアミノ酸置換はこれまで少ないとされてきた。日本においても BSE 罹患牛が検出されるにつれ、罹患牛の PrP 遺伝子多型を解析する機会が得られつつある。本研究では、BSE 罹患牛が報告されているホルスタ

イン牛の PrP 遺伝子多型を評価するデータベースを作る目的で、これまでに収集してきたホルスタイン牛の PrP 遺伝子型を検討した。

B. 研究方法

研究対象検体：羊と山羊の検体に関しては、2001 年 11 月より開始されている羊と山羊のスクレイピーサーベイランスにて全国から帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室に送付された羊 117 検体 (5 自治体：栃木県、青森県、宮城県、佐賀県、石川県) と山羊 40 検体 (5 自治体：八丈島、青森県、宮城県、広島県、北海道) である。また、山羊を多く食している沖縄県から血液サンプル 38 検体を、スクレイピーのサーベイランスで検体を多く送付して頂いた八丈島の血液サンプル 42 検体も PrP 遺伝子型調査の検体として用いた。牛の検体については、帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室にて 10 年間収集蓄積してきたホルスタイン牛由来の DNA サンプル 49 検体を検査した。

検査方法：羊の PrP 遺伝子多型に関しては、112 番 (メチオニン/トレオニン)、136 番 (アラニン/バリン)、154 番 (アルギニン/ヒスチジン)、171 番 (グルタミン/アルギニン/ヒスチジン) の 4 箇所のアミノ酸置換を 1 塩基置換解析 (SNPs) で解析した。山羊に関しては、PrP 遺伝子を PCR 法にて増幅後、ダイレ

クトシークエンスにより塩基配列を決定し、アミノ酸の置換を解析した。牛の PrP 遺伝子多型に関してもダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究で検索した羊と山羊の検体は総てと畜場にてと殺された動物の組織であり、実験動物にかかわる問題はない。また、牛の検体は、帯広畜産大学の病理学教室にて病理解剖された検体であり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

羊および山羊の PrP 遺伝子の構造とアミノ酸多型:羊と山羊の PrP 遺伝子の構造と今回検出されたアミノ酸多型を図1に示した。羊および山羊の PrP 遺伝子は共に 256 個のアミノ酸からなり、野生型は同一のアミノ酸配列である。しかし、アミノ酸多型は兩種で異なり、154 番(アルギニン/ヒスチジン)のみが兩種で共通に検出される多型である。今回の研究により山羊では報告されていないアミノ酸多型(127 番セリン、146 番セリン、211 番グルタミン)を検出した。

羊 PrP 遺伝子のアミノ酸多型:今回検索した羊 PrP 遺伝子の4箇所のアミノ酸置換を表1に示した。羊 PrP 遺伝子の野生型である MARQ 型は検査した 117 検体中 60 検体を占め最も優位な遺伝子型であった。スクレイピーに高感受性の 136 番バリンをヘテロに有する羊は1頭と少なかった。一方、スクレイピーに抵抗性のアミノ酸置換 171 番アルギニンを有する羊は、ホモで5頭、ヘテロで36頭と意外と多かった。今回の検索では 154 番ヒスチジンの置換を有する羊は検出されなかった。

山羊 PrP 遺伝子のアミノ酸多型:今回検索した検体は、沖縄 38 検体、八丈島 42 検体、北海道 1 検体の合計 81 検体である。アミノ酸の置換が観察された箇所は7箇所、アミノ酸の置換を伴わない変異は2箇所であった。スクレイピーに抵抗性を示すとされる 142 番メチオンと 143 番アルギニンのアミノ酸置換も検出された。検出された山羊の PrP 遺伝子型を基にアリルに分類したところ、合計で8型に分類さ

れた(表2)。GPI アンカーの添付により除かれる 240 番のアミノ酸置換を除外して、約 83% の山羊が野生型のアリルを有していた。スクレイピーに抵抗性とされるアリル5とアリル6を有する山羊は少なかった。

牛の PrP 遺伝子の構造とアミノ酸多型:牛の PrP 遺伝子の構造は、オクターリピート数により3群に分類されるが、6回のリピートを有しており Accession Number D10643 と同じ配列を有する検体が49検体中42検体を占めて優位であった。7回のリピートを有する牛は検出されなかったが、5回のリピートを有する牛は5頭検出されたが、Accession Number D90547 とは3箇所アミノ酸配列が異なっていた。検索した 49 頭のホルスタイン牛の内1頭で広範囲な欠失領域を有する牛を検出した(図2)。欠失領域はリーダーシークエンスの 11 番目のアミノ酸からオクターリピートの終わった 106 番目のアミノ酸までの 96 アミノ酸であった。

D. 考 察

今回の研究で、羊においては抵抗性の 171 番アルギニンを有する羊が予想以上に多く日本で飼育されていることが明らかとなった。ただ、今回検索した検体は5自治体と少なく片寄っていることから、日本全土で飼育されて食されている羊の遺伝子型に関しては不明である。日本で食されている山羊に関しては今回はじめて PrP 遺伝子のアミノ酸多型が明らかとなった。その結果、抵抗性のアミノ酸置換は少なく、羊の遺伝子型同様に野生型が多いことから、今後ともスクレイピー感染に関して注意が必要である。牛の PrP 遺伝子解析は、これまでの DNA 試料を用いてのデータベース作りであったが、日本のホルスタイン種は6回のリピート数を有したものが優位に多く、一部の牛検体でアミノ酸の置換も検出された。1頭のホルスタイン牛で大きな欠失を有する PrP 遺伝子を有していることが明らかとなったことは、牛群の中にも PrP 遺伝子の変異が起きていることを示しており、今後の研究素材として活用が期待される。