

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

プリオン病の診断技術の開発に関する研究
平成 14 年度総括研究報告書

主任研究者 品川森一

平成 15 年 (2003) 年 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	
1. BSE スクリーニング用E L I S A 法の実用化に関する研究 -----	6
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)	
2. 遺伝子導入マウスを用いたヒト・プリオン病の感染実験 -----	11
北本 哲之 (東北大学大学院医学系研究科 病態神経学講座)	
3. プリオンバイオアッセイ法の研究 - 遺伝子導入マウスの有用性と早期診断の実用 化に向けて -----	14
毛利 資郎 (九州大・大学院・実験動物学)	
4. 白オリックスプリオン遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの作成及びノックアウト マウスとの交配 -----	21
小野寺節 (東京大学農学部応用免疫)	
5. 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 -----	23
堂浦 克美 (九州大学大学院医学研究科 脳研病理)	
6. プリオン病の診断技術の開発に関する研究 -----	25
田村 守 (北海道大学 電子科学研究所)	
7. プリオン病の高感度診断技術の開発 -----	27
高橋 秀宗 (国立感染症研究所 感染病理部)	
8. イムノ磁気ビーズと標識抗体を用いたプリオン検出法の開発 -----	30
岡田 義昭 (感染症研究所 細菌血液製剤部)	
9. B S E 診断の為のウエスタンブロット (WB) 法の改良 -----	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とE L I S A 標準品への適用 -----	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 -----	38
IV. 研究成果の刊行物・別刷り -----	39

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）
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 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究要旨

(1)スクリーニング検査が輸入キットを用いてELISA法で実施されている。昨年度までの成果を下に、国産として初めて同等の感度を持ち、非特異反応抑制と簡便化を目標としたキットを完成し、実用のために農林水産省の審査を受けている。

(2)ウエスタンブロット法の迅速化のため、使用ゲルの検討並びに試料調製法を検討し、さらに1時間半短縮可能となった。

(3)作製したキメラヒト型PrP遺伝子ノックインマウスでも、多様なヒトプリオン病すべてを網羅して感受性が増すわけではなく、複数種の遺伝子改変マウスが必要なことが判った。ただ、腹腔内接種によりFDCに蓄積するプリオンを指標に早期診断が可能になったことが明らかになった。

(4)シロオリックス(Or)PrP遺伝子導入マウスTg(ORPrP+/+)Prmp0/0の脳、骨格筋及び心筋に遺伝子の発現が観察された。

(5)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に換えて、indene環化合物でもプラーク型異常プリオン蛋白を描出できたが、シナプス型に沈着したプリオンは描出できなかった。

(6)蛍光相関分光法(FCS)を用いた高感度プリオン検出の基礎研究を行い、FCSの有効性を確認した。

(7)プリオン病の補助診断として脊髄液中の14-3-3蛋白の定量系を開発した。上昇が認められた場合、時間を経て再度測定することにより、診断精度を上げることも可能となった。

(8)PrPを認識する抗体をコーティングした磁気ビーズ、及びポリエチレングリコールを用いて株化白血病細胞表面及び培養液から濃縮し、PrP^{Sc}が検出できた。プリオン運搬のベクターの存在を探るため、神経系と免疫系を繋ぐ因子を調べ、SDF-CXCR4系の可能性が示唆された。

(9)細胞株T98Gの産生するPK抵抗性のPrPの産生最適条件とPK抵抗性の程度を明らかにし、PrPがヒト異常プリオン蛋白の代替標準品として使用できることを明らかにした。

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・動物衛生研究所・プリオン病研究センター長

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

堂浦 克美・九州大学・助教授

田村 守・北海道大学・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

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

a) 前年度までに検討したmAbの中から、反応性のよい抗体の組み合わせを選び、すでに開発しているサンドイッチELISAの系を基に反応系を検討してELISAキットを完成させた。

b) 擬陽性反応が出現する原因を明らかにして、該反応が低い試料調整法を開発した。

c) BSE確認検査に用いるウエスタンブロット法の迅速化を図るために、試料調製段階アルコール類の添加によるPK消化の影響を調べた。さらにS DS ポリアクリルアミドゲル組成とサイズおよび泳動条件、プロテイング条件を検討した。

d) 細胞株T98Gの産生するPK抵抗性のPrPの産生最適条件とPK抵抗性の程度を明らかにした。

2) バイオアッセイによるPrP^{Sc}の検出

a) 全ヒト型PrP遺伝子をノックインにより導入したマウスに各種ヒトプリオンの感染を行い、PrP遺伝型及びプリオン型と潜伏期の関係を検討した。

b) シロオリックス PrP^C 遺伝子発現 Pm⁰⁰ マウスの各種組織の PrP^C の発現を検討した。

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

モデルとして、プリオン病感組織を用いて、Congo・red 関連化合物より優れた化合物を探索するため、脳への移行性が優れ、半減期の短い indene 環化合物を選んでプリオン蓄積を描出できるか検討した。

4) CJD の補助診断として 14-3-3 蛋白定量法を確立し、有用性を検討した。

5) プリオンの新規で高感度診断法開発のため、蛍光相関分光法(FCS)を検討した。

6) 血液中のプリオン運搬ベクター検出のため、神経と免疫を繋ぐ因子の検討を行った。

(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

1) BSE スクリーニング ELISA 法の実用化
試料調製法：以前に確立した方法の酵素処理時間、処理条件を検討し、非特異反応を抑えながら、時間の短縮を図ることができた。

検出系：Capture 抗体として 44B1, 検出用抗体として 72-5 を選び、72-5 を Fab として酵素標識した直接法を開発した。さらに反応時に試料と抗体を同時に加えて迅速化をはかった。本キットを現在我が国でスクリーニングに使用されている PLATERIA とウエスタンブロット法の感度を BSE 牛試料を用いて比較したところ、ウエスタンブロット法がやや感度が高く、PLATERIA と同じであった。また、スクリーニング検査で陰性と判定された 894 検体は本キットでも全例が陰性と判定された。現在、国産として初めて実用のために農林水産省の審査を受けている。

2) ウエスタンブロット法の迅速化
PrP^C/非特異タンパク質の PK 感受性は 5% の 2 ブタノール添加で最も分解促進効果が認められた。また、ブタノール添加で PrP^C が過剰に分解される事も無かった。一方、新規ゲルは 400-500V の高電圧を用いることができ、電気泳動に 15 分、転写に 18 分と従来の電気泳動システム (泳動 60 分、転写 60 分) に比べて検査に要する時間を大幅に短縮することが可能であった。

(3) バイオアッセイシステム

1) 作製したキメラヒト型 PrP 遺伝子ノックインマウスの評価

キメラヒト型 PrP 遺伝子ノックインマウスは MM1, MV1 及び MM1S タイプで PrP タイプ 1 の CJD では潜伏期 150 日と感受性が高かったが、同じ PrP タイプでも MM1P は潜伏期が 700 日以上でも発症せず、感受性が低かった。PrP タイプ 2 の場合は 100% 発症するわけではなく、潜伏期も 400 日以上であった。MM2 タイプでは発症に 300 日以上を要した。VV2 は 600 日を超しても発症していない。すなわち今回のマウスは多様なヒトプリオン病すべてに感受性が高いわけではなく、複数種の遺伝子改変マウスが必要なことが判った。腹腔内接種により F D C に蓄積するプリオンを指標に早期診断が可能ながことが明らかになった。

2) シロオリックス (Or) PrP 遺伝子導入マウス Tg(ORPrP+/+) Pmpo/o

o-Pmp ホモのマウスの脳、筋肉、心臓、に RT-PCR によって mRNA が検出された。さらに、ORPrP も確認した。また 30 週齢より心筋の一部に変性が観察された。

3) 非侵襲的なプリオン・バイオイメージング法の開発の基礎研究

GSS 脳切片を用いて 76 種の置換 indene 環化合物を調べたところ、27 種の化合物が小脳皮質を中心にクルー斑に一致した斑状の強い蛍光シグナルが見られた。一方、sCJD 患者脳の灰白質に見られる瀰漫性の微細顆粒状の異常プリオン蛋白沈着に一致する蛍光シグナルは、全ての indene 環化合物すべてで観察されなかった。マウススクレイパー脳切片では GSS のクルー斑を描出した置換 indene 環化合物は、粗大顆粒状の異常プリオン蛋白沈着を描出できなかった。

4) 蛍光相関分光法(FCS)を用いた高感度プリオン検出の基礎研究

抗プリオン抗体に蛍光ラベルし、プリオン蛋白との抗原-抗体反応を計測を行い、プリオン蛋白質の液相での直接検出が可能であることを確認した。更に、蛍光ラベルの改良点、抗体の力価等についても予備的検討を行った。これらの結果より実用化が可能であると結論した。

5) プリオン病の補助診断として脊髄液中の 14-3-3 蛋白の定量系の開発

脊髄液中 14-3-3 ガンマ蛋白は脳挫傷後 4 日目では 700 ng/ml を超えていたが、1 ヶ月で正常値 (15 ng/ml) へ戻った。しかし、CJD 患者では回復しなかった。すなわち、上昇が認められた場合、時間を経て再度測定することにより、診断精度を上げることも可能となった。

6) イムノ磁気ビーズと標識抗体を用いたプリ

オン検出法の開発

各種細胞株での PrP^{Sc} の発現は神経系由来の細胞株に著明な発現が認められ、血球系細胞株では非常に弱く、その中では B 細胞系の株が比較的強かった。磁気ビーズを用いた培養上清からの検出では、PrP^{Sc} の量は細胞の発現量に一致し、神経系細胞株で強く、血球系は B 細胞株だけであった。PEG を用いた濃縮では 3% から 8% の濃度で PrP^{Sc} が沈殿した。また、神経系細胞株において RT-PCR にて SDF の発現と B 細胞株の SDF への遊化性を認めた。プリオン運搬のベクターの存在を探るため、神経系と免疫系を繋ぐ因子を調べ、SDF-CXCR4 系の可能性が示唆された。

7) 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質の調製

T98G 細胞の産生する PrP^{Sc} の発現機構を調べた。細胞を 3 回継代後 38 日培養では、10 μ g/ml の PK に抵抗性の PrP は産生されなかったが、13 回継代後 39 日培養では、10-20 μ g/ml の PK に抵抗性の PrP が産生された。3 回継代後に 150 日間培養しても PK 抵抗性を示さなかった。T98G 細胞の PK 抵抗性 PrP を PNGase すると分子量は 18 kDa を示した。T98G 細胞のコードン 129 は Met/Val であった。長期間の継代後に細胞を液体窒素中に保存し、解凍後に PrP^{Sc} の産生を調べた。T98G 細胞 subclone 104 株を 3 回の継代後に 36 日間培養すると、250 μ g/ml の PK 処理にも耐性を示した。また、培養 36 日間後の細胞を新たに播種すると、4 日後の細胞も PrP^{Sc} を産生した。

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。今年度、2001 年に我が国で BSE が発見されて以来、スクリーニング検査に用いられている EKISA キットと感度は同等で、非特異反応の少ない実用的なキットが完成した。現在、審査を受けている段階であるため、極近い将来、国産のキットによる検査も可能となろう。報告書には間に合わなかったが、単に化学発光の検出系を用いるだけで感度が 10 倍は増加することが明らかとなった。ウエスタンブロットではゲルを換えて高電圧を使用することにより、迅速化が図れ、確認検査の時間短縮に貢献できる。さらに直説法の併用を考慮すると、ELISA 法に匹敵する迅速化が期待できる。

ヒト型遺伝子改変マウスを用いたバイオアッセイにより、ヒトプリオン病の種の壁が解

消したと考えられたが、プリオンの型によっては解消されないことも明らかとなった。さらなる遺伝子改変マウスの作製が必要である。残念ながら、シロオリックス PrP 遺伝子導入マウスの実用性を研究期間内に明らかにできなかった。

非侵襲的なプリオン・バイオイメーキング法に用いる化合物を検討したが、アミロイド斑の検出に止まった。シナップスに沈着するような、より微細なプリオンの凝集体とも結合する化合物の探索が必要であろう。現在、各種プリオン検査の陽性対照として、合成ペプチド、組み替えプリオン蛋白あるいは不活化したマウス馴化プリオンが用いられている。プリオン非感染細胞からマーカーとして利用可能な PK 抵抗性のプリオン蛋白が得られることが判り、検査の標準化に利用する期待がもたれる。

E. 結論

国産の ELISA キットが完成した。ウエスタンブロット法のさらなる迅速化が可能となった。

ヒトプリオンに多様性があるため、バイオアッセイ系の遺伝子改変マウスは複数種用意する必要があることが判った。

蛍光相関分光法の導入により、超高感度プリオン検出の可能性が出てきた。

非侵襲的なプリオン・バイオイメーキング法の開発にはシナップスタイプの異常プリオン蛋白と結合する化合物の探索が必要である。

プリオン非感染細胞から異常プリオン蛋白のマーカーとなりうる蛋白の産生条件が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Kitamoto, T., Mohri, S., Ironside JW, Miyoshi, I., Tanaka, T., Kitamoto, N., Itohara, S., Kasai,

- N., Katsuki, M., Higuchi, J., Muramoto, T., Shin RW. Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(2): 280-286, 2002.
- Yamamoto, A., Shin RW, Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F., Kitamoto, T. Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 82(5):1137-1147, 2002.
- Ishizawa, K., Komori, T., Shimazu, T., Yamamoto, T., Kitamoto, T., Shimazu, K., Hirose, T. Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathol.* 104(4):342-350, 2002.
- Sasaki, K., Doh-ura, K., Ironside, WJ., Iwaki, T. Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol.* 103:199-208, 2002.
- Shyu, W-C., Ham, H-J., Saeki, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Onodera, T., Chen, C-J., Hsu, Y-D., Chiang, Y-H. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol. Neurobiol.* 26: 1-12, 2002.
- Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 728-733, 2002.
- Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmyadag, D., Byambaa, B. and Shinagawa, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 75-81, 2003.
- Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Miyoshi, I., Mohri, S. and Takata, M. Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie. *J. Vet. Med. Sci.* 65(3): (in press), 2003.
- 品川森一、堀内基広、石黒直 ガストロピロール 原末のスクレイピープリオン汚染の検定 *医薬品研究* 33(7): 455-461, 2002
- 品川森一 BSE の早期診断 (牛肉は安全か?) *ファルマシア* 38: 321-325, 2002
- 堀内基広 プリオンの検出技術 *臨床検査* 46(12):1545-1551, 2002
- 堀内基広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, 2002
- 毛利資郎、ヒト・プリオンのバイオアッセイ. *臨床検査*, 46:1553-1558, 2002
- 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タンパク質検出に関する検討 *日本食品衛生学雑誌*43:173-177, 2002
- ## 2. 学会発表
- Mohri S. : Mouse model of Creutzfeld-Jakob disease and its application for highly sensitive detection of infectivity. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (18th ICC 2002 Kyoto) and the 42nd Annual Meeting of Japan Society of Clinical Chemistry (42nd JSCC) , 21 October 2002.
- Doh-ura K, et al: Intraventricular infusion of PPS: an immediately available therapy for TSEs. International Conference on TSEs (Edinburgh), 2002
- Kubo I, Doh-ura K, et al: Chemicals with a quinoline ring are potent inhibitors of abnormal prion protein formation. International Conference on TSEs (Edinburgh), 2002
- Ishikawa K, Doh-ura K, et al: BSB as a therapeutic and diagnostic chemical for TSEs. International Conference on TSEs (Edinburgh), 2002
- Sasaki K, Doh-ura K, et al: Clusterin/apolipoprotein J is associated with accumulation of prion protein in the follicular dendritic cells. International Conference on TSEs (Edinburgh), 2002
- Doh-ura K, et al: Intraventricular infusion of PPS as an immediately applicable treatment for prion diseases. International Conference New Perspectives for Prion Therapeutics (Paris), 2002
- 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
- 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
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 PrPSc 産生阻害 第133回日本獣医学会学術集会(東京)、2002年4月
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
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
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
毛利資郎:ヒト・プリオン高感受性マウスの開発、第49回日本実験動物学会シンポジウム(名古屋市)、2002年5月
堂浦克美:プリオン病の治療薬剤の開発 第75回日本生化学会大会(京都)、2002年10月
大内史子、山河芳夫、西島正弘:プリオン病のプロテオーム解析 第75回日本生化学会大会(京都)、2002年10月
中村優子¹、山河芳夫¹、西島正弘、佐伯 圭一、小野寺節:ウイルス感染時におけるプリオンタンパク質の機能関与 第75回日本生化学会大会(京都)、2001年10月
菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、松田治男、山崎壮、棚元憲一、澤田純一:ヒト・グリオーマ細胞の蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質産生機構の解析 第75回日本生化学会大会(京都)、2002年10月
掛谷知志、菊池裕、高鳥浩介、山崎壮、棚元憲一、澤田純一:ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gにおける熱ショックによるプリオン蛋白質の発現 第75回日本生化学会大会(京都)、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

病原性プリオンタンパク質生成阻害剤およびその使用方法
発明者:堂浦克美、久保郁子
特許願 2002-265321
2002年9月

BSEスクリーニング用 ELISA 法の実用化に関する研究

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

我が国の BSE 検査精度の向上に寄与するため、および今後も世界市場の拡大が予想されることから、現在用いられている方法以上の感度・精度を有する BSE 検査法の実用化は重要な課題である。我々は独自に確立した試料調製法と抗 PrP 抗体を使用した BSE スクリーニング用 ELISA(OFR ELISA)の性能を評価するために、BSE 感染牛の脳組織を非感染牛の脳組織で希釈した試料を用いて、確定検査に使用されているウエスタンブロット法および一次スクリーニングに使用されてる PLATELIA BSE DETECTION KIT との、検出感度・精度の比較を行なった。7 検体中 5 検体で PLATELIA と同等、1 検体で PLATELIA より 4 倍感度が高く、1 検体で PLATELIA よりも感度が低かった。従って、OFR ELISA と PLATELIA は同等の感度を有していると考えられる。WB との比較では、4 検体中 3 検体で WB が 4~16 倍高感度で、1 検体は WB と同等の感度であった。また、食肉衛生検査所から入手した約 900 例の BSE 陰性牛についても、陰性と判定された。以上の結果から、OFR ELISA は実用化可能な性能を有していると考えられる。また、OFR ELISA の試料調製法は基本的に確定検査に使用している方法と同じであることから、確定検査法のキット化などにも応用可能である。

A. 研究目的

現在、日本における BSE スクリーニングは、一次検査としてバイオラッド社の PLATELIA BSE DETECTION KIT、確認として、ウエスタンブロット(WB)および免疫組織化学(IHC)が行われている。一次検査では多検体処理かつ試験当日中に結果を出す必要があることから、迅速性・簡便性が求められる。PLATELIA BSE DETECTION KIT は 1999 年 7 月の EC の BSE 検査キットの性能評価で最も感度が高いことが報告されている。しかし、より高感度、高精度、あるいは簡便な方法があるならば、検査精度の向上や検査の効率化が可能となる。また、PLATELIA は高価であることから、より安価なキットの開発が求められている。さらに、

今後、世界的に BSE 検査キットの需要増加が予想されることから、実用的な BSE スクリーニング法の開発は依然重要な研究課題である。そこで、我々がこれまでに改良を加えてきた異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})検出用 ELISA(OFR ELISA)の実用化に向けて、OFR ELISA の感度・特異性の検討を行なった。

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検討した。また、抗原抗体反応の短縮化を目的

として、HRP 標識抗 PrPmAb72-5 を用いる直接法の導入を試みた。最終的な感度の比較は、BSE 感染牛の脳を非感染牛の脳で希釈することで、PrP^{Sc} の蓄積の少ない脳を模倣し、そこから PrP^{Sc} の検出を行った。

C. 研究結果

試料調製法は最終的に表 1 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ズ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^{Sc} を回収する際に 2-Butanol を加え、脂質除去を行う工程からなる。回収した PrP^{Sc} 画分を 8M 尿素で変性後に、これを PBS で 4 倍に希釈して ELISA 用試料とした。

検出法は表 2 に示した 3 種の方法を検討した。組換え rBoPrP を用いた検出感度は、A 法が 2.5ng、B 法が 310pg、C 法が 630pg であった(表 3)。検出感度と所要時間を考慮して、mAb44B1 を固相化して、HRP 標識 mAb72-5 で検出する C 法を採用した。

C 法(OFR ELISA)の牛延髄からの PrP^{Sc} の検出感度を、PLATELIA BSE DETECTION KIT および確定検査用ウエスタンプロット法と比較した(表 4)。PrP^{Sc} の量が均一になるように、BSE 牛延髄約 1g を細切したのち脳乳剤を作製した。非感染牛の脳乳剤も同様に作製して、BSE 感染牛脳乳剤を非感染牛脳乳剤で 4 倍段階希釈した。英国から輸入した BSE 牛の延髄 7 検体を用いて試験した結果、5 検体で OFR ELISA と PLATELIA の検出限界が同じで、1 例で OFR ELISA のほうが感度が高く、残りの 1 例で PLATELIA の法が感度が高かった。ウエスタンプロットとの比較では、1 例で検出限界が同じであったが、残りの 3 例ではウエスタンプロットの法が 4 から 16 倍感度が高かった。また、BSE スクリーニング検査で陰性と判定された 894 検体は、OFR ELISA でも全て陰性と判定された。

D. 考察

BSE 牛由来の試料を用いた試験から、OFR ELISA は PLATELIA BSE DETECTION KIT と少なくとも同等の検出感度を有することが明らかとなった。OFR ELISA は試料調製

時の誤差を少なくする目的から、試料調製に時間を要するが、ELISA に固相化抗体による PrP の捕捉と、HRP 標識抗体による PrP の検出を同時に行なう、1 段階法を採用して、免疫反応に要する時間を短縮している。合計の所要時間は PLATELIA と OFR ELISA で大差ない。OFR ELISA は、現在行われている一次検査で用いている機器を使って実施可能である。以上の PLATELIA BSE DETECTION KIT との性能比較の結果から、OFR ELISA は実用可能な BSE スクリーニングキットであると考えられる。

E. 結論

OFR ELISA は、PLATELIA BSE DETECTION KIT と同等の感度を有することが判明した。前者は試料調製に時間を要し、後者は免疫反応に時間を要する、という違いはあるものの、全工程に要する所要時間は同程度である。従って OFR ELISA は実用可能な BSE スクリーニングキットとしての性能を有していると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究では BSE 感染牛の組織を扱っている。BSE 感染牛の試料は帯広畜産大学の P3 レベル実験施設内で行なった。汚染物はプリオンの不活化に有効である 800 度以上の焼却処理、あるいは、135°C 30 分のオートクレーブ処理している。

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

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).

堀内基広(2002) プリオンの検出技術 臨床検査 46(12) 1545-1551.

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

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

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

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

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

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

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、富士レピオ

表1 試料調製法

処理	試薬・使用機器	条件
乳剤作製	マルチビーズショッカー	2000rpm、30sec
前処理	Collagenase(250ug/50mg tissue) DNase I(20ug/50mg tissue)	37°C、30min
PK 処理	Proteinase K(20ug/50 mg tissue)	37°C、30min
PK 停止	Pefabloc (2 uM)	
脂質除去	2-Butanol	
濃縮	遠心	15000rpm, 10 min, 20°C
変性	8M Urea	100°C、5min

表2 ELISA の検出系

方法	抗原捕捉用抗体の固相化	検出用抗体
A	mAb44B1	Biotinylated mAb72-5 + avidin-HRP
B	Strepto-Avidin + biotinylated mAb44B1	HRP-conjugated mAb72-5
C	mAb44B1	HRP-conjugated mAb72-5

表3 各検出系の検出感度

rBoPrP/well(ug)	A 法		B 法		C 法	
10.0	0.293 ± 0.021	+	0.825 ± 0.026	+	0.587 ± 0.014	+
5.0	0.110 ± 0.006	+	0.383 ± 0.015	+	0.247 ± 0.005	+
2.5	0.062 ± 0.001	+	0.186 ± 0.006	+	0.121 ± 0.003	+
1.25	0.049 ± 0.002	-	0.098 ± 0.002	+	0.071 ± 0.003	+
0.63	0.047 ± 0.002	-	0.056 ± 0.002	+	0.050 ± 0.002	+
0.31	0.049 ± 0.005	-	0.036 ± 0.001	+	0.041 ± 0.001	+
0.16	0.046 ± 0.006	-	0.027 ± 0.001	+	0.036 ± 0.001	-
0.0(N.C.)	0.046 ± 0.002	-	0.020 ± 0.001	-	0.032 ± 0.001	-
Cut off	0.056		0.025		0.036	

表 4 OFR ELISA, PLATELIA およびウエスタンブロット法(WB)の PrP^{Sc} 検出感度

BSE 陽性検体	検査法	BSE 感染牛脳希釈列					
		4 ⁻¹	4 ⁻²	4 ⁻³	4 ⁻⁴	4 ⁻⁵	4 ⁻⁶
#4	OFR	+	+	+	+	-	-
	PLATELIA	+	+	+	+	-	-
	WB	+	+	+	+	+	+
#5	OFR	+	+	+	+	-	-
	PLATELIA	+	+	+	+	-	-
	WB	+	+	+	+	-	-
#6	OFR	+	+	+	+	+	-
	PLATELIA	+	+	+	+	-	-
	WB	+	+	+	+	+	+
#7	OFR	+	+	+	+	+	-
	PLATELIA	+	+	+	+	+	-
	WB	+	+	+	+	+	+
#11	OFR	+	+	+	-	-	-
	PLATELIA	+	+	+	+	-	-
#12	OFR	+	+	+	-	-	-
	PLATELIA	+	+	+	-	-	-
#13	OFR	+	+	+	-	-	-
	PLATELIA	+	+	+	-	-	-

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）
分担研究報告書

遺伝子導入マウスを用いたヒト・プリオン病の感染実験

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

ヒト・マウスキメラ型遺伝子を導入したノックイン・マウスとトランスジェニック・マウスを用いて、ヒト・プリオンの感染実験を行った。用いたヒト・プリオンとして、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）、英国のバリエーション型CJD（vCJD）、家族性CJD、家族性ゲルストマン・ストロイスラー病を検討したが、今回はsCJDとvCJDの結果を中心に報告する。sCJDとしては、コドン129の正常多型であるM（メチオニン）とV（バリン）、そして異常プリオン蛋白のタイピングでタイプ1とタイプ2に分類し、それぞれMM1やMM2と表記して感染実験の結果を報告する。また硬膜移植例CJDの結果についても十分な期間の観察が可能であったので、合わせて報告する。ヒト・プリオンは遺伝子型また異常プリオン蛋白のタイピングによって多様であり、一種類の遺伝子導入マウスであらゆるプリオンに対応するのは困難であるというのが本研究のまとめである。

A. 研究目的

ヒト・プリオン病は、臨床症状が多様なだけでなく病理像も多様である。このような多様性は、部分的には異常プリオン蛋白のタイピングによってまたその遺伝子の多型性によって説明可能であるが、それ以外の不明の因子も存在する。今回は、我々の開発したヒト型マウスがどのようなプリオン病に高い感受性を示すのかをヒト・マウスキメラ型の遺伝子導入したマウスを用いて検討し、多様なプリオン病に対応したマウスの必要性を考察する。

B. 研究方法

1) ヒト型のマウスモデルとして、ヒト・マウスキメラ型プリオン蛋白を発現するノックイン・マウスとトランスジェ

ニック・マウスを用いて感染実験を行った。

- 2) sCJDとしてMM1型とMV1型、さらにVV2型の大脳皮質を用いて10%脳乳剤をPBSにて調整した。同様にvCJDの3例、硬膜移植例として古典的CJD（MM1S：MM1に相当してシナプス型の異常プリオン蛋白の沈着を示すもの）とアミロイド斑型CJD（MM1P：MM1に相当してアミロイド斑型の異常プリオン蛋白の沈着を示すもの）も大脳皮質を同様に処理して感染実験を行った。
- 3) 発病を確認したマウスおよび死亡したマウスは、そのマウスの脳の半切の病理標本を作製し、病的に海綿状態を観察し免疫染色で異常プリオン蛋白の

有無を検討した。また一般臓器（特にリンパ組織）での異常プリオン蛋白の有無を検討した。さらに異常プリオン蛋白のタイピングを Western Blot 法を用いて検討した。タイピングは、Proteinase K 処理後のサンプルをそのままプロットしたパターンと、PNGase F で糖鎖を取り去った後の分子量を検討してタイピングを決定した。

C. 研究結果

1) 異常プリオン蛋白がタイプ1の症例の感染実験

トランスジェニック・マウスでも、ノックイン・マウスでも約150日という短期間で100%の発病率を誇ったのはsCJDのMM1タイプである。sCJDのMM1タイプは日本のsCJDの大多数を占めるタイプであり、このタイプにはキメラ型のプリオン蛋白が有効であることが明らかとなった。同様に短期間で感染が確認されたのはsCJDのMV1タイプと硬膜例の古典型CJD(MM1S)であった。これらはいずれも異常プリオン蛋白はタイプ1に属するものであった。同じタイプ1の異常型プリオン蛋白を有する硬膜移植のアミロイド斑型CJD(MM1P)は、3症例の脳を使って感染実験を行ったが700日を越す観察期間を経てもいまだ一匹のマウスの発病も認められない。硬膜移植例のアミロイド斑を有するタイプは、MM1であるにも関わらずアミロイド斑を有するという特異なCJDであり、日本以外の欧米でもまずsCJDにこのタイプのCJDの報告はない。

2) 異常プリオン蛋白がタイプ2の症例の

感染実験

タイプ2の感染実験に関しては、100%の成功率を示した症例はなかった。各タイプごとに症例の感染実験の結果を報告する。vCJDの3例は、長期間の潜伏期間を必要とし、ノックイン・マウスが華々しい症状を呈することはなかった。臨床症状も明らかなものではなく、400日を越えて死亡したマウスの脳内にアミロイド斑が多数認められた。アミロイド斑は、脳内接種部位に多く認められ、中にはCSFに投与したと思われるマウスで広くCSFに接する部位に多数のアミロイド斑が検出された。一部の600日を越えるマウスではシナプス型の沈着も認められた。

MM2タイプの症例（視床型CJD）では、300日以上潜伏期間の後、視床の外側膝状体を中心にやや大きな異常プリオン蛋白の沈着を呈し、海綿状脳症の程度は軽いものであった。

VV2のsCJDの症例の感染実験は、600日を越えて陰性の結果であった。

3) 異常プリオン蛋白のタイプはヒト化マウスモデルでは再現できたのか？

発病または異常プリオン蛋白が認められたマウスの脳のWestern blotの結果は、明らかなものであった。MM1のsCJDを感染させたマウスの脳では21KDの異常プリオン蛋白（タイプ1に相当）が検出され、MM2のsCJDの症例の感染させた脳からは19KDの異常プリオン蛋白が認められた。vCJDの感染実験ではvCJDに認められるようにDi-glycoformの多い異常プリオン蛋白が検出され、その異常プリオン蛋白は21KDと19KDの丁度真中の分子量

を呈した。

D. 考察

キメラ型プリオン蛋白を発現するヒト化マウスを用いた感染実験の結果をまとめた。このキメラ型プリオン蛋白を発現するマウスは s CJD 中の MM1、MV1 に対して高い感受性を示したものの、硬膜移植例のアミロイド斑を有する CJD に対しては感受性が低く、十分な観察期間の後も発病には至っていない。また、タイプ 2 の異常プリオン蛋白を持つ CJD 症例の感染実験においては、VV2 の症例で発病せず、MM2 や v CJD においても異常プリオン蛋白は検出できるものの、長期の観察期間が必要でまた臨床症状を示すことは稀であった。ヒトのプリオン病は、多様なタイプが存在する。我々の開発したヒト化モデルは大多数を占める MM1 の CJD に対しては高い感受性を示したものの、いまだ少数例ではあるが硬膜移植例の MM1P (アミロイド斑型) や VV2 などの症例のバイオアッセイとしては不十分で、今後キメラ型以外のヒト化マウスの開発が不可欠であることを示している。

E. 研究発表

1.論文発表

1) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin RW. Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 7;294(2):280-6.

2) Yamamoto A, Shin RW, Hasegawa K, Naiki H, Sato H, Yoshimasu F, Kitamoto T. Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2002 Sep;82(5):1137-47.

3) Ishizawa K, Komori T, Shimazu T, Yamamoto T, Kitamoto T, Shimazu K, Hirose T. Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathol (Berl).* 2002 Oct;104(4):342-50.

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）

「プリオン病の診断技術の開発に関する研究」班平成14年度報告書

プリオンバイオアッセイ法の研究

一遺伝子導入マウスの有用性と早期診断の実用化に向けて一

分担研究者：毛利 資郎（九州大・大学院・実験動物学）

研究協力者：北本 哲之（東北大・大学院・病態神経学）

研究協力者：三好 一郎（東北大・大学院・動物実験施設）

研究協力者：松浦 裕一（九州大・大学院・実験動物学）

研究要旨

プリオン病研究にとって実験動物は重要不可欠の解析ツールであり、とりわけプリオンの感染性検出のためにはバイオアッセイが唯一の方法である。しかしながら、ヒト、ウシ、ヒツジなどのプリオンを実験小動物へ伝播するには種の壁が存在する。種の壁を克服するための第一段階としてプリオンタンパク質の一次構造を同じくすることを目的にヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質遺伝子導入マウス（以下, Tg マウス）ならびに同じ導入遺伝子構造のノックインマウス（以下, Ki マウス）を作製し、伝播試験を行った。その結果、Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) の伝播において平均 150 日で全例発病し、これらの遺伝子導入マウスはヒト・プリオンに対して高感受性であることが明らかになった。しかしながら、Tg マウスでは脾臓やリンパ節に異常プリオン蛋白質の沈着はほとんど認められなかった。ところが、Ki マウスでは脾臓やリンパ節の濾胞樹状細胞（FDC）にごく初期から異常プリオン蛋白質の沈着を認めた。

FDC における異常なプリオン蛋白質はバイオアッセイにより感染性を有することが明らかとなった。また、正常なプリオンタンパク質の発現が FDC におけるプリオン沈着に関与すること、腹腔内投与によるプリオンの伝達、発症に FDC が関与している可能性が示唆された。

- A. 研究目的
- が存在すが、これを克服するための第一段階
プリオンを実験小動物へ伝播するには種の壁 としてプリオンタンパク質の一次構造を同じく

したヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質遺伝子導入マウス(以下,Tgマウス)ならびに同じ導入遺伝子構造のノックインマウス(以下,Kiマウス)を作製した。そして、ヒト・プリオンの伝達試験の結果、TgマウスもKiマウスも脳内接種後に150日前後で発症することが判明した。本年度は中枢神経以外のFDCにおける異常プリオン蛋白質のうち感染性の確認と種の壁を乗り越えたか否かを含めてKiマウスにおける感染力価の基準作製を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) FDC における異常プリオンタンパク質の経時的沈着

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD)患者の脳乳剤(H3)をKi-ChMマウスに腹腔内接種後、14日、30日、45日、60日、75日、150日後にそれぞれ安楽死させ、ホルマリンに固定後、免疫組織染色により脾臓、腸間膜リンパ節、腸粘膜集合リンパ小節(パイエル板)における異常プリオン蛋白質の沈着について検索した。

2) 脳内接種と腹腔内接種の潜伏期間、脾臓の感染性

Codon129がメチオニンのTgマウス(Tg-ChMと表す)、Kiマウス(Ki-ChM)とcodon129がバリンのKiマウス(Tg-129ChV)に孤発例患者由来ヒト・プリオン(H3)を脳内接種(ic)、腹腔内接種(ip)し、接種から発病までの潜伏期

間を調べた。また、ic後発症したKi-ChMとTg-ChM30の脾臓の10%乳剤を作製し、それぞれKi-ChMにicの後、潜伏期間を調べた。

3) 感染価の測定

ヒト孤発例CJD患者由来のプリオン(H3)をKi-ChMにic後発症したマウス脳乳剤の段階希釈(10^{-1} ~ 10^{-7})とヒト脳乳剤H3の段階希釈(10^{-1} ~ 10^{-8})をそれぞれ作製し、Ki-ChMマウスにicし、潜伏期間と発症率を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての繁殖、感染実験は九州大学大学院医学研究院動物実験指針に従い、実験計画は九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の審査を受け承認されている。

動物の苦痛排除・軽減のための具体的方策として接種はエーテル麻酔下で行い、発症した動物に関しては終末期に至る前にエーテル麻酔下で断首により安楽死させた。

C. 研究結果

1) 孤発性CJD患者の脳乳剤(H3)をIP後、免疫組織染色により14日後にすでに4例中2例、50%(2/4)の脾臓で異常プリオン蛋白質の沈着が検出され、30日後以降はすべての脾臓が100%陽性となった。腸間膜リンパ節でも14日後に33%(1/3)陽性となり、経日的に増加し、60日後以降は100%を示した。パイエル板ではやや遅れて45日後から検出され、75日後に100%

(4/4) となった (図 1)。

2) H3 脳内接種後の潜伏期間は Ki-ChM と Tg-ChM30 では 151 日、156 日と有意の差は認められなかったが、Tg-ChV12 と Tg-ChV21 は遅れてそれぞれ 175 日、192 日であった。腹腔内接種後の潜伏期間は Ki-ChM が 283 日であるのに対して Tg-ChM30 では 384 日と有意有意に延長した。Tg-ChV12 ではさらに延長している。中枢神経以外の脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の FDC に関して、Ki においては検索された FDC のほとんどが異常なプリオン蛋白質陽性となったのに対して、Tg では一部に陽性が認められたに過ぎなかった。特に、Tg-ChM30 では検索された 3 臓器はすべて異常なプリオンタンパク質陰性であった。

Ki-ChM と Tg-ChM30 の脾臓の 10% 乳剤 ic 後、Ki-ChM の脾臓乳剤は平均 163 日ですべて発症したのに対して Tg-ChM30 の脾臓乳剤は 403 日以上経過しても全頭は発症していない (表 1)。

3) Ki-ChM マウス脳乳剤は 10^{-1} 希釈で 109 日で発症し、希釈に従い潜伏期間が延長した。マウス発症脳における 1g あたりの LogID_{50} はおよそ 8.16 と算出できた。他方、ヒト脳乳剤は 10^{-1} 希釈で 141 日の潜伏期間を示し、希釈に従い延長しているが、発症途中であるために LogID_{50} の算出はまだ出来ていない (表 2)。ヒト脳乳剤は最終的には期間と感染価をプロットして近似線を引くことによって潜伏期間と感染

価の関係が得られる予定である。

D. 考察

われわれのヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質を発現する遺伝子改変マウスを用いると孤発例ヒト・プリオンは脳内接種後 150 日程度で発病が確認されていたが、Ki マウスにおいては特に腹腔内接種後のわずか 14 日から脾臓とリンパ節の FDC において異常なプリオン蛋白質の沈着が検出できた。75 日後にはパイエル板も含めて 100% 陽性になることが判明した。これにより、FDC を用いたヒト・プリオンのバイオアッセイが可能であること、そして、実用化に向けた試験的なヒト・プリオンの検出には 100% 陽性となる接種後 75 日が適当であると判断した。

Ki マウスの FDC に沈着した異常なプリオン蛋白質にはかなり高い感染価があること、それは表 2 の成績から推定して脳の $1/1000$ から $1/10000$ 程度であることが判った。さらに、免疫組織染色ではまったく検出できなかった Tg-ChM30 の脾臓にも感染性があることが判明した。このことはバイオアッセイのプリオン検出感度が免疫組織化学による検出感度より鋭敏であることの証明でもある。

腹腔内接種後の発症に関して、直接脳内に接種して感度が 150 日程度と同様であった Ki-ChM と Tg-ChM30 の発症までの潜伏期間が大きく異な

り、Tg-ChM30は大きく延長した。このこととFDCにおける異常プリオン蛋白質の沈着の有無、感染価を併せて考えると、FDCにおけるプリオンに対する機能が、末梢からの感染、発症に関与している可能性が考えられ、興味深い。

感染価と希釈の関係についての結果は一部途中であるが、 10^{-1} から 10^{-3} までの結果から推定すると、ヒト脳乳剤のki-ChMを用いた感染価はマウス脳乳剤の1/100から1/1000程度であると思われる。このことはヒト化Kiマウスをにおいてもヒト・プリオンとマウス・プリオンに対する感受性の違いが依然として残っているとも考えられる。われわれのバイオアッセイの改良余地のひとつである。

E. 結論

1. ヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウスの腹腔内接種でごく初期からFDCにプリオンが検出されたがトランスジェニックマウスでは認められなかった。
2. ノックインマウスのFDCによるプリオン沈着を指標にした比較的迅速なバイオアッセイの方法が確立された。
3. プリオン腹腔内接種後の感染、発症にFDCの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Horiuchi, H., Nemoto, T., Ishiguro, N., Furuoka, H., Mohri, S. and Shinagawa, M.: Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9): 3421-3426, 2002.

・Kitamoto T., Mohri S., Ironside J. W., Miyoshi I., Tanaka T., Kitamoto N., Itohara S., Kasai N., Katsuki M., Higuchi J., Muramoto T. and Shin R-W.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 294, No. 2: 280-286, 2002.

・毛利資郎、ヒト・プリオンのバイオアッセイ。臨床検査、46巻12号：1553-1558、2002。

2. 学会発表

・Mohri S.: Mouse model of Creutzfeldt-Jakob disease and its application for highly sensitive detection of infectivity. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (18th ICCCL 2002 Kyoto) and the 42nd Annual Meeting of Japan Society of Clinical Chemistry (42nd JSCC), 21 October 2002.

毛利資郎：ヒト・プリオン高感受性マウスの開発、第49回日本実験動物学会シンポジウム（名

古屋市), 23 May 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし