

厚生労働科学研究費補助金  
食品安全確保研究事業

# 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15年度 総括・分担研究報告書

平成16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)

平成 15 年度食品安全確保研究事業  
牛異常プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染メカニズムに関する研究班  
班員名簿

氏 名	所 属
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座
品川 森一	動物衛生研究所プリオン病研究センター
山河 芳夫	国立感染症研究所細胞化学部
松田 治男	広島大学大学院生物圏科学研究科
千葉 丈	東京理科大学基礎工学部生物工学科
田村 守	北海道大学電子科学研究所超分子分光分野
堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科創生応用医学センター
菊池 裕	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部
松田 潤一郎	国立感染症研究所獣医科学部
石黒 直隆	帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室
古岡 秀文	帯広畜産大学病態獣医学講座
三好 一郎	名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター
小野寺 節	東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学教室
森 清一	北海道立畜産試験場畜産工学部
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
高橋 秀宗	国立感染症研究所感染病理部
佐々木裕之	埼玉県中央食肉衛生検査センター

## 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15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 牛海綿状脳症の病理診断に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7  
分担研究者 佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）
- 3 プリオン蛋白質の構造解析とプリオン感染の不活化・・・・・・・・・・・・ 11  
分担研究者 堀内 基広（北海道大学大学院獣医学研究科）
- 4 我が国の BSE プリオンの生物学的性状の解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 16  
分担研究者 品川 森一（動物衛生研究所プリオン病研究センター）
- 5 異常型プリオンプリオンタンパク質の生化学的検出・・・・・・・・・・・・ 21  
分担研究者 山河 芳夫（国立感染症研究所細胞化学部）
- 6 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・・・・ 25  
分担研究者 松田 治男（広島大学大学院生物圏科学研究科）
- 7 高親和性抗プリオンタンパク質抗体の作製とその利用・・・・・・・・・・・・ 27  
分担研究者 千葉 丈（東京理科大学基礎工学部生物工学科）
- 8 プリオン病の診断技術の開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29  
分担研究者 田村 守（北海道大学電子科学研究所）
- 9 プリオン蛋白免疫組織化学法の改良と病態マーカーの探索・・・・・・・・・・・・ 33  
分担研究者 堂浦 克美（東北大学大学院医学系研究科 創生応用医学センター）

1 0	プリオン蛋白の細胞内動態と食品試験への応用・ . . . . .	3 7
	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)	
1 1	高感度ハイオアノセイ系の開発・ . . . . .	4 1
	分担研究者 松田潤一郎 (国立感染症研究所獣医科学部)	
1 2	動物プリオンタンパクの遺伝子解析・ . . . . .	4 5
	分担研究者 石黒 直隆 (帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室)	
1 3	動物プリオン病の病理学的診断に関する研究・ . . . . .	5 1
	分担研究者 古岡 秀文 (帯広畜産大学病態獣医学講座)	
1 4	ウシ海綿状脳症の感染 発症機構の解明・ . . . . .	5 7
	分担研究者 三好 一郎 (名古屋市立大学大学院医学研究科)	
1 5	トランスシェニノク培養細胞株を用いた感染実験解析・ . . . . .	6 3
	分担研究者 小野寺 節 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	
1 6	疑似患畜を用いた発症前のプリオン動態・ . . . . .	6 5
	分担研究者 森 清一 (北海道立畜産試験場・畜産工学部)	
1 7	カニクイサルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発・ . . . . .	6 9
	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)	
1 8	BSE モデル動物を用いた病理学的解析・ . . . . .	7 3
	分担研究者 高橋 秀宗 (国立感染症研究所感染病理部)	
1 9	脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するための とさつ解体処理方法の開発・ . . . . .	7 7
	分担研究者 佐々木裕之 (埼玉県中央食肉衛生検査センター)	

# I. 総括研究報告書

# 1. 総括研究報告書

## 「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。スクリーニング法の開発も進み、確認検査法の改良が行われた。わか国のBSE例における伝達性解析が進み、来年度にはおよその成果が得られよう。本年度にウシプリオン遺伝子改変マウスの一部でプリオンの伝達を証明されたことは特筆に値する。一方で発症機構の検討を目的とした動物実験が開始され、来年度以降、成果が期待される。培養細胞を用いた実験系の開発も進行中である。また研究資源も順調に蓄積され、研究班内で分与や共同研究が促進された。と畜法の改良につながるデータも得られている。本年度までの進捗状況は良好と考えられ、来年度には大きな成果が得られると期待している。

### 分担研究者（17名）

古岡 秀文 帯広畜産大学畜産学部獣医学科家畜病理学教室 助教授  
堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学教室 教授  
品川 森一 動物衛生研究所プリオン病研究センター センター長  
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 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  
千葉 丈 東京理科大学基礎工学部生物工学科 教授  
田村 守 北海道大学電子科学研究所 教授  
堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科創生応用医学センター 教授  
菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部第3室 主任研究員  
山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化子部 室長  
三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター 助教授

松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長  
小野寺 節 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授  
高橋 秀宗 国立感染症研究所感染病理部第三室 室長  
森 清一 北海道畜産試験場畜産工学部 部長  
寺尾 専治 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  
佐々木裕之 埼玉県食肉衛生検査センター 所長

### 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全頭検査が始まり、平成16年3月までに計9頭が摘発され、端緒となった例と最近の死亡牛検査で1例が農水省の家畜保健衛生所で発見され、わか国では現在11頭のBSEが見つかったことになる。昨年カナダと米国でもBSE例が摘発された。BSEの原因と考えられるヒトの変異型クロイツフェルトヤコフ病(vCJD)はわか国では発見されて

いない。英国等世界では 156 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の重要課題であることはいうまでもない。

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、病理学およびハイオアッセイによる検査法、プリオン不活化法、と畜法の改良等、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トヤコブ病の発生対策に資することを目的とする。

## B 研究方法

BSE プリオンはハイオセーフティレベル 2 の病原体であり、BSE プリオンをウシプリオン遺伝子改変マウスで増殖させる実験の場合はレベル 3 としている。農水省の大型実験動物感染実験では、ウシへの BSE プリオン脳内接種はレベル 2 で、体内感染であるため 1 ヶ月後にはレベル 1 となり、発症後の剖検はレベル 3 となるという。各分担研究者の所属する施設でプリオンを取り扱えるレベル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。また、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。ウシ遺伝子改変マウスや BSE ウシ検体、BSE 実験感染ウシ検体、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、分担研究者の実験研究に役立てることで研究を加速する。既知のこく、種のハリアーがあるため

実験動物の発症には通常 1 年以上の潜伏期間を要する。昨年度および本年度で、4 プリオン遺伝子改変マウスの作製にめとかつき、サルやウンテの感染実験をスタートしているか、いまだ途上であり、最終評価には 3 年を越える可能性も考えられる。本年度は、旧品川班が昨年度に終了したため、旧班員から本研究班に 7 名の研究者を分担研究者として追加した。各分担研究者の研究方法の詳細は各報告書を参照してほしい。

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)、千葉、堀内)、病理組織での検出方法の検討(佐多、堂浦、古岡)、プリオン蛋白質のウエスタンブロット法の検討(山河、堀内)、蛍光相関分光法を利用した新しい検査法の開発(田村)、標準陽性サンプルの開発(菊池)、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(佐多、山河、松田(潤))。

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、従来のプリオン検査法の改良とともに、近交系マウスを用いた解析(品川) 遺伝子改変マウスによるハイオアッセイ系の開発(松田(潤))、マウス、ウシ、サル等の実験動物モデルの作製(高橋、森、寺尾)と解析(山河、古岡、佐多)、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)、プリオン接種マウスでのマイクロアレイ法による遺伝子解析(三好)、そしてプリオン病病態解析を目的とした培養細胞系の開発(小野寺)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、これらを総合的に検討し、有効な食肉汚染防止法を開発する(佐々木)。

(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ついて行う。「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。またプリオンの取扱いは、国立感染症研究所におけるハイオセー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

BSE 確認検査のうち病理・免疫組織化学法を1日で終了する迅速検査法を開発した(佐多)。免疫組織化学法では抗原賦活化法がキポイントであり、今回新しいかつ高感度化法を開発した(堂浦、古岡)。またウエスタンブロット法についても高感度化し、非定型 BSE 例が診断できた(山河)。PrP 分子の構造および性状解析を目的に プロテナーゼ抵抗性コアフラグメントの N 末端構造についてモノクローナル抗体で検討し、6 例の BSE は同して 103AA 近傍まで消化されていることが示唆された。またヒツシスクレイピーでは分子量が異なり、構造の多様性鑑別が可能であることと日本のスクレイピーには複数の株が存在する可能性を示した(堀内)。ニワトリの抗プリオンモノクローナル抗体が BSE プリオンと特異的に反応すること、ファージで作製した抗体を二価化すると著しく高い反応性を有することを確認した(松田治)。高親和性抗プリオンタンパク質抗体を作製するため DNA 免疫法を開発し ポリクローナル抗体を開発した(千葉)。蛍光相関分光法で多量検体を微量で測定することかてきる小型で安価な測定装置を開発し、全自動化システムを構築している(田村)。BSE 検査の標準品確保を目的とし、ヒトグリオブラストーマ細胞株 TG98G が産生するプリオンタンパク質の性状を解析したところ、標準品としては不適合であることがわかった(菊他)。ウン

プリオンの高感度ハ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行い、ファウンター4系統を作出した。うち1系統でヘテロに遺伝子をもつマウスでは脳内接種後104日脾臓にプリオンが検出された。プリオン遺伝子ホモマウスおよびほか3系統は検討中である(松田潤)。

### 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

わか国で発見された BSE プリオンの生物学的性状について近交系マウスに接種して解析したところ、英国例と類似した糖鎖型および分子量が認められた。ほかの BSE 例についても検討中で、ウシ遺伝子改変マウスでの感染実験も進行中である(品川)。ウンとヒツシの PrP 遺伝子多型について検討したところ、667 頭のウシでは6回のオクタリピートをもつウシは595 頭で、234 番と576 番に塩基置換がみられたか、アミノ酸置換はみられなかった。転写調節領域で12塩基欠失例は49/126 頭であった。ヒツシではスクレイピー感受性を示す136番ハリンをもつものは少なかった(石黒)。プリオン病の早期診断および感染 発症機構の解明を目的として、マイクロアレイによる発現遺伝子プロファイリングを行った(三好)。Doppel 蛋白非産生の1型プリオン遺伝子欠損マウスから神経細胞株を樹立し、種々の動物プリオン遺伝子を導入し、培養細胞での感染実験が可能となった(小野寺)。ウシプリオン遺伝子改変マウスでは脾臓の二次濾胞にプリオンの発現がみられ、蟻酸や塩酸処理で消失した(高橋)。BSE 疑似患者15頭について定期的に臨床症状、血液、髄液、尿を採取し検討を行ったかとくに異常は見られなかった。9頭の子牛に BSE プリオンを脳内接種した。1頭が2日後に死亡したか、残りについて実験中である(森)。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、および終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サルに BSE プリオンを接種した。3ないし6ヶ月後の安楽死



サルおよび経過観察中のサルではとくに異常は認められなかった(寺尾)。

### 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、と畜時のスタンニング、ピッシング操作、背割り位置と神経組織汚染との関連について、枝肉、ブロック肉、市販食肉を用い、GFAPをマーカーとして、全国8カ所の食肉衛生検査所にて検討した。ピッシングやスタンニングによる血液への神経組織の混入についてはすべて検出限界以下であった。枝肉の内側と頭側で陽性検体が認められ、背割り時の汚染による神経組織の残留が枝肉洗浄後も存在することかわかった。ブロック肉には3/11に陽性となったが、市販食肉ではすべて陰性であった。と畜方法について137施設にアンケートを実施したところ、頭蓋に穴をあけるスタンニングはすべて、ピッシングは73%で、背割り前の脊髄吸引で60%以上取られているのか60%、正中での背割りは94%、自動高圧洗浄装置による枝肉の洗浄は38%で行われていた。神経組織汚染は正中での背割りによるので、正中からずらした背割り法の普及が必要と考えられた(佐々木)。

## D 考察

### 1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発

スクリーニング検査として期待される蛍光相関分光法の小型装置が完成し、来年度にデータを取ることか可能となった。一方、抗プリオンモノクローナル抗体が開発され、本報告書に記載はないが、いくつかのELISAキットが作製されつつあり、来年度にはデータの比較か可能となろう。新規のモノクローナル抗体も開発されつつあり、うまく使うことでわか国のBSE例の解析か進むと思われる。確認検査で使われる病理免疫組織化学法の改良か進み、迅速化か可能となり、また高感度化を目指した抗原賦活化法も開発された。リンタングステン酸を用いるウエスタンブロット法も実用化され、実際の診断に応用された。本年度、とくに強調したいのはウシ遺伝子改変マウスか順調に作製さ

れ、脳内接種により104日後に脾臓でプリオンが検出されたことである。現在もあらたな系統か作製されつつあり、来年度には初期の目標を達成できる可能性が高くなった。したかつて、この分野の研究は順調な進捗状況にあると考えられ、来年度の成果か期待できる。

### 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

免疫化学的方法でのプリオンの検出のみならず、動物への伝達性(感染性)と性状解析の研究は重要である。本年度にその一部の結果か得た。わか国のBSE例は11例となったが、現在ではそのうちの9例までかマウスへの接種により検討中である。ウシプリオン遺伝子改変マウスへの接種も始まり、生化学的および病理学的解析か進んでいるので、この分野の研究成果は来年度にはほぼ出そろい、わか国のBSEの性状か明らかにできると思われる。

ウシやヒツシのプリオン遺伝子解析か進み、BSE例に特徴はみられなかったか重要な基礎データとなる。マイクロアレイによる解析は初期段階にあるか、興味ある結果か期待される。培養細胞での解析法の開発は将来重要な手段となる。

マウスのみならず、ウシへの感染実験かわか国でも始まり、サルへの感染実験と相まって、世界でも少ないBSEプリオンの動物実験か開始された。これらの感染実験には時間がかかり、来年度には結果はでないとも思われるが、研究資源の蓄積により、新たな解析方法が開発された際には重要なサンプルとなり、研究の広がりか促進できるであろう。そのため、研究資源の管理配布の原則についてマニュアル化を進めている。

### 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

と畜時における大脳や脊髄神経組織の食肉へ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および普及につなかっていくものと期待される。

## E 結 論

研究班の3本の柱のそれぞれに順調な進捗があった。来年度にはより大きな成果が期待できる。

## 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）。

## H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1 特許取得

なし。

### 2 実用新案登録

なし。

### 3 その他

なし。

## II. 分担研究報告書

## 2. 牛海綿状脳症の病理診断に関する研究 —迅速病理診断法の開発—

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 佐藤 由子、樋口 好美、長谷川秀樹、永田 典代、  
中島 典子、高橋 秀宗（同感染病理部）

研究要旨 確認検査の病理・免疫組織化学検査を、受付した同日の夕方までに結果か出せるように迅速包埋・迅速免疫組織化学法を開発した。BSE 陽性例の海綿状変化等の病理組織所見を十分観察することかてき、また免疫組織化学の結果についても現行のマニュアルの方法とほぼ同等であった。しかし検索した BSE 陽性例は少ないので今後とも検討を続けていく必要がある。

### A 研究目的

わか国の BSE 検査は、と畜され食用になる牛の全頭を対象とし、と畜場で特定部位（脳、脊髄、眼、回腸、扁桃、脊柱）を除去することと、延髄門部を採取し食肉衛生検査所で ELISA 法によるスクリーニング検査によって行われている。再検査でも疑陽性を示した延髄標本は凍結のまま、およびホルマリン固定後に確認検査に回される。ELISA 検査の残りの検体、および凍結延髄組織からさらに採材した検体でウェスタンブロット検査が行われ、午前9時に受付すると同日の夕方には結果か判明する。しかし、病理組織および免疫組織化学検査は、形態観察のために、形態保持を目的とした組織の十分なホルマリン固定とパラフィン包埋処理過程が重要であるため、通常の方法では短時間で行うことは一般に困難である。現在の BSE 確認検査マニュアルでは、ほぼ1日半の工程を経て、翌日の午後1時には結果か判明する。この方法自体、世界で最速であるものの、実際上は種々の観点から1日で結果か判明することか望まれている。そこで脳組織の迅速標本作製および迅速な病理・免疫組織化学検査か1日で終了可能となる方法について検討し、現在のウェスタンブロット法と同じ程度の時間で、受付したその日の夕方5時までには結果か判明するような、より迅速病理検査法を開発し、さらに実際の病理免疫組織化学検査でその応用について検討することを目的とした。

### B 研究方法

#### 1) ウシ延髄組織

BSE のないウシ延髄組織は帯広畜産大学で病理解剖されたウシおよび ELISA 陰性高齢牛を食肉衛生検査所から分与して頂いた。BSE 陽性ウシの延髄組織は確認検査の残りの検体を用いた。いずれもホルマリン固定された組織標本である。

#### 2) パラフィン包埋法

マイクロウェーブ包埋装置(Milestone 社、<http://www.milestonesrl.com>)を用いて包埋した(図1)。包埋方法は説明書記載の方法を参照し、その後いくつかの点を改良した。ウシ延髄組織は食肉衛生検査所でホルマリン固定され、確認検査のため、および依頼により分与された組織を用いた。それぞれのホルマリン固定時間は一晩から1年間までである。

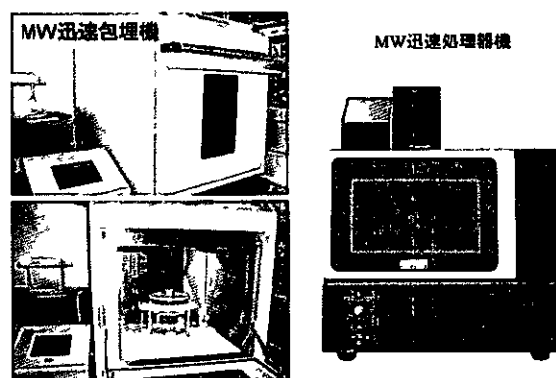


図1 使用した迅速包埋器（左）と免疫染色用の迅速処理機。

### 3) 前処理法および免疫組織化学法

この包埋装置には、抗原賦活化法として120°Cのオートクレーブ処理と同様な処理が可能なガラス製の反応容器が準備されている。まず、マニュアル通り1mM HCl/DDWで抗原賦活化を行い、その後至適条件を求めた。抗プリオン抗体は、現在使われているB103やT4ペプチドウサキ抗体および44B1と43C5のマウスモノクローナル抗体を用いた。免疫染色の反応には、マイクロウェーブ迅速試料処理装置（東屋医科器械、MI-77型）を用い（図1）、反応時間を適宜検討した。Envision+およびDABを用いて検出および発色反応を行い、ヘマトキンリンで核染を行った。

（倫理面への配慮）

行政検査として行われている残りの動物検体であり、倫理上問題はない。

## C 研究結果

### 1) パラフィン包埋方法

ホルマリン固定と蟻酸処理はいままでと同じ方法を使い、50%アルコール以後の処理過程を全面的に見直した。その結果、脱水過程を4工程、乾燥1分、パラフィン包埋1工程の計21時間とした。いままで全自動包埋器を使って全処理時間を45時間以下にはすると形態観察には全く不適な標本しか作製できなかったが、今回は約半分に短縮することかてきた。このパラフィン包埋組織からHE標本を作製し検討したところ、まず通常の切片の厚さで薄切することが難しいこと、白質の髄鞘の不規則な拡大がみられること、血管周囲の空隙がやや大きいこと、そして染色ムラがみられることなどの欠点が認められた（図2）。しかし、海綿状変化のあったBSE例でも海綿状変化を観察することか可能であり（図3）、また下記に述べる通り、免疫組織化学法ではやや検出シグナルの強度が低下するほかは問題なく、プリオン抗原を検出することかてきた。また、さまざまなホルマリン固定時間の標本を使って包埋を行ったか、得られた結果はホルマリン固定時間とは何ら関係がないことかわかった。

そこで、包埋工程を再度見直し、脱水過程をより長くしたり、使用するアルコールの濃度、種類および温度を変えたり、またパラフィン包埋工程も時間と温度を変えたりしたか、基本的に大きな改善は得ることかてきなかつた。そこで、脱水後の置換における乾燥工程を見直すことにした。この機器での最大の特徴は、乾燥工程によりパラフィン包埋時間を短縮することか可能となったということかであったので、結局、最後の検討課題となった。キンレンを40°Cに加温し20分間の置換工程をいれることか、HE標本の品質は劇的に改善した。しかもホルマリン固定時間による差異には、前回同様、関連はなかつた。しかし一部にやや染色ムラかてきた（図4）。免疫組織化学については前記の方法の結果と大差は認められなかつた。

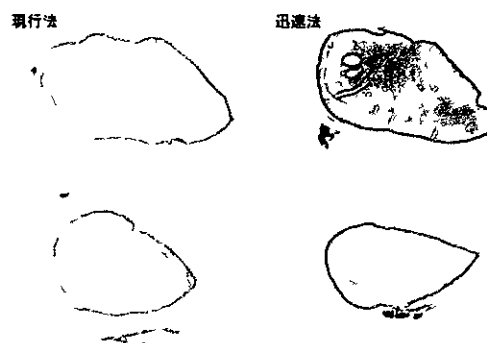


図2 現行法では脱水・パラフィン置換のバランスよく、形態学的観察には問題はない。切片も薄く薄切かてき、HE染色ではムラかない（左上下）。迅速法では、包埋過程に問題があつて組織保存か良くない、切片の薄く切れない、また染色ムラかてきしてしまう（右上下）。

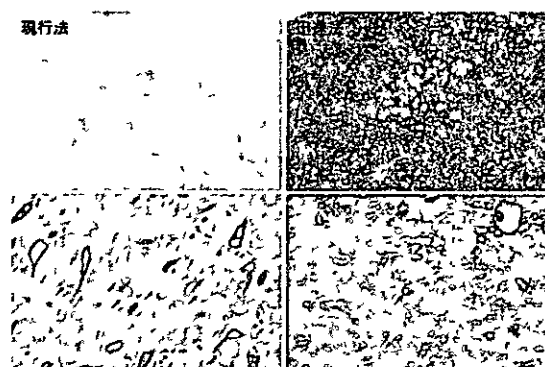
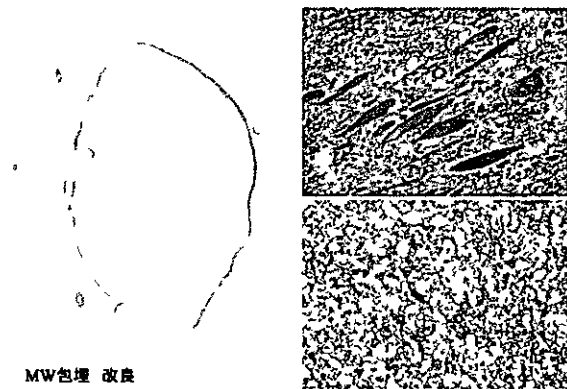


図3 現行法と迅速法の組織での比較。矢印は海綿状変化。



MW包埋 改良

図4 置換行程にキシレンを使った結果、ほぼ満足のいくHE染色標本が作製できた。

前処理工程では 1mM HCl/DDW に浸漬し 120℃、10 分の処理を行ったところ、切片の破壊がおこったため、温度を 110℃に低下させた。その結果、免疫組織化学の反応条件としては問題なく検出が可能であった。これはオートクレーブと異なり反応装置の容量の差異によるものと考えられた。

## 2) 病理・免疫組織化学法

マイクロウェーブ迅速処理器による反応は、250W の出力でマイクロウェーブの照射と停止をそれぞれ 4 秒、2 秒とし、これを 10 分間行うことで、マイクロウェーブを使わない場合と比較して 3-4 分の 1 の約 1 時間で行うことが可能となった。ただし陽性シグナルはやや弱い結果となった。これは前処理条件のうち、温度条件の低下と関連していると思われる。しかし、抗体濃度を倍に濃くし DAB 発色を調整することで埋め合わせかてき、通常の方法と同じシグナルを得ることが可能であった (図 5)。また反応時間が短いせいか、以前認められた非特異反応が見られなくなった (図 6)。

これらの方法について図 7 にまとめた。

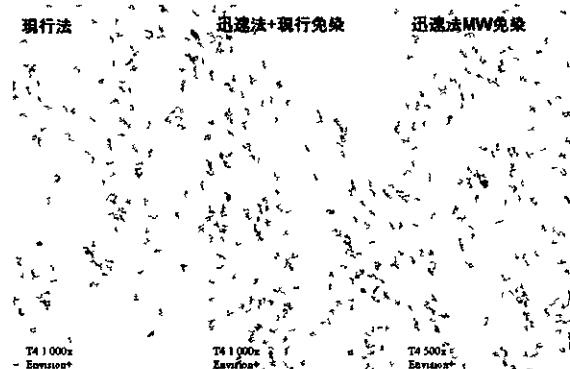


図5 新しい MW 機でプリオンの免疫組織化学染色を行ったところ十分な感度が得られた。

## D 考察

従来から病理組織検査領域では、種々の反応にマイクロウェーブを用いて反応温度を上昇させ、とくに抗体との反応ではブラウン運動の増加により、反応時間の短縮が可能で、しかも検出感度上昇が得られることか 1980 年代の中頃から報告されてきた。今回用いた T/T Mega は免疫反応のみならず、パラフィン包埋工程にマイクロウェーブを用いることで、通常は室温で行う脱水工程を 68℃まで上昇させて反応させることにより、反応時間の短縮を可能とするものである。この機器は未固定凍結生検組織切片では形態保存の良くない欠点を短時間のホルマリン固定と迅速パラフィン包埋することで解決した機器であり、肝臓や腎臓などの比較的小さな生検組織を対象としたものである。従って今回のような大きさの脳組織を対象とは考えていないために条件が考慮されていなかった。また、脂質の多い脳組織では従来 1 週間以上の十分なホルマリン固定と時間をかけた脱水操作が必要とされてきたか、現在のマニュアルで使われている 4 時間半のプロトコルでほぼ問題なく標本が作製できることか判明し、さらに短時間で処理することが可能となった。したかつて、この包埋方法はほかの目的にも使用可能と考えられ、汎用性があると思われる。

組織形態保存にもっとも効果を与えたものは、置換工程にキシレンを使用したことであった。脱水にアルコールを使い、パラフィンを十分組織内に浸透させるため、通常有機溶媒が使われる。キシレンは現在代表的なものである。

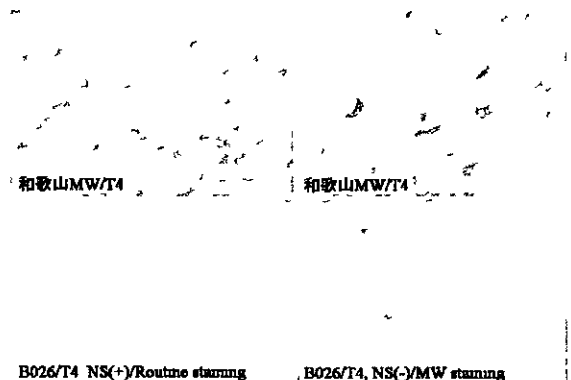


図6 新 MW 免疫染色では、ほぼ以前の方法による検出感度と同じと考えられた。ただし、以前非特異反応が認められた例でも非特異反応は見られなかった。

## 迅速包埋免疫染色法のプロトコール 2004 2 1

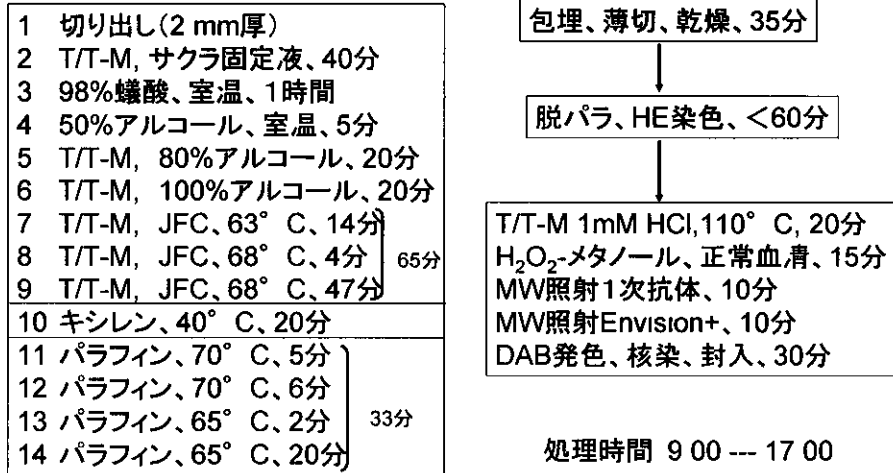


図7 今回の迅速包埋免疫染色法。

原法は乾燥であったか、脂質の多く結合織の少ない脳組織では、その後のパラフィン浸透が十分ではなく、薄切困難や形態保存性の低下等が生じていたと考えられる。キシレンでの置換工程を加えた結果、上記の問題はほぼ解決したと考えられる。しかしながら、一部ではHE染色性にムラが観察されたので、脱水、置換、包埋のバランスがまだまだ十分ではないと思われ、今後さらに検討が必要と考えられる。

免疫組織化学法では、マイクロウェーブ法を応用することで反応時間の短縮が可能であることは十分知られていたか、反応抗体液の液温をモニターすることかできず、また照射のムラを解決することかなかなかできていなかった。T/T/Megaでも抗体反応は可能であるものの、実際は免疫染色陽性所見か、通常の方法と比較して、一様ではなく、使えなかった。今回のマイクロウェーブ処理装置はこのあたりの問題を解決することか可能な照射方法か使えることか、染色ムラのない結果を得ることか可能となった。反応時間の短縮は全体か約半分以下となった。今後は使用する抗体と Envision+、そして発色反応液の組成等について検討を加え、至適反応条件を見出したい。そして、正常延髄組織での非特異反応の有無を調べ、実際の確認検査に使用できるようにしていきたい。

### E 結論

確認検査の病理・免疫組織化学検査を、受付した同日の夕方までに結果か出せるような迅速包埋・迅速免疫組織化学法を開発した。

### F 健康危険情報

とくになし。

### G 研究発表

#### 1 論文発表

Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T, the Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan Atypical protease resistant prion protein (PrP<sup>res</sup>) observed in an apparently healthy 23 month old Holstein steer Jpn J Infect Dis 2003, 56 221-222

### 3. 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 北海道大学大学院獣医学研究科教授

研究要旨 異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) を蛋白質分解酵素 (Proteinase K, PK) 処理して得られる PrP<sup>Sc</sup> の PK 抵抗性コアフラグメント (PrP<sup>Core</sup>) の N 末端構造の多様性は、PrP<sup>Sc</sup> 構造の簡易鑑別法としての利用価値がある。そこで PK 切断領域近傍を認識する抗 PrP 抗体を使用して、日本で発生した BSE および羊スクレイピーの PrP<sup>Core</sup> の N 末端の構造の比較を試みた。抗体のエピトープを pepspot 膜、ファースティスプレイ法、および欠損変異組換え PrP との反応性により詳細に検討し 使用抗体を選別した。オクタペプチトリプト中の PHGGGWG を認識する mAb110、WGQ を認識する mAb106、および B103 ポリクローナル抗体との反応性、および PrP<sup>Core</sup> の分子量から、PrP<sup>Core</sup> の N 末端の構造の相違を解析した。2003 年 1 月までに日本で発生した BSE6 例の PrP<sup>Core</sup> は全て分子量が同してあった。また、BSE 由来 PrP<sup>Core</sup> は mAb110 および mAb106 と反応しないことから、PK により aa103 の近傍まで消化されていることが示唆された。一方、供試した羊スクレイピー 11 例のうち、SB は PrP<sup>Core</sup> の分子量が 2kDa 程度小さく、SB 由来の PrP<sup>Core</sup> は BSE の PrP<sup>Core</sup> と同様に、mAb110 および mAb106 と反応しなかった。SB 以外の羊スクレイピー由来 PrP<sup>Core</sup> は mAb110 および mAb106 と反応した。これらの結果は、mAb110、mAb106、および B103 を使用して PrP<sup>Core</sup> の末端の構造の多様性を簡易に識別できること、および、日本の羊スクレイピーには複数の株が存在する可能性を示している。

#### A 研究目的

BSE は一種の株しか存在しないと考えられてきたが、最近、BSE にも複数の株が存在することか明らかとなった。また、羊スクレイピーに複数の株が存在することか知られている。BSE 病原体や羊スクレイピー病原体の株のタイピングには、RIII、C57BL/6、VM マウスなどに接種した時の潜伏期、および神経病理組織学検査によるリーションプロファイルが使用されてきたが、これは 2 年余りの歳月を必要とする。一方、PrP<sup>Sc</sup> の糖鎖型や分子量などの生化学性状により、プリオンの株を分類する方法も報告されている。生化学的手法による解析は比較的短時間で結果が得られることから、プリオンの株の簡易型別への応用が期待されている。酵素 (Proteinase K, PK) 処理して得られる PrP<sup>Sc</sup> の PK 抵抗性コアフラグメント (PrP<sup>Core</sup>) の N 末端構造の多様性は、PrP<sup>Sc</sup> 構造の簡易鑑別法としての利用価値がある。そこで、PrP<sup>Core</sup> の

PK 切断部位近傍を認識する複数の抗 PrP 抗体を使用して、BSE および羊スクレイピー由来 PrP<sup>Core</sup> の N 末端構造の多様性が解析可能であるか否かについて検討した。

#### B 研究方法

抗体のエピトープ解析には pepspot 膜を用いた。詳細にエピトープを解析するために、Ph D-12 ヘプチトファーシライブラリ (クローンテック社) を用いてファースティスプレイ法により、エピトープの同定を行なった。抗体を固相化したシャーレにファースライブラリを加え、ハイオパニング法を 3~5 回繰り返した後に、20 個以上のプラークのペプチコート領域の塩基配列を決定した。また、aa24-242、aa86-242、aa94-242、aa103-242 の N 末端欠損組換え牛 PrP を大腸菌にて発現 精製し、エピトープ解析に使用した。

BSE 感染牛およびスクレイピー感染羊の脳



乳剤を、コラゲナーゼ処理した後に、 $40\mu\text{g}/100\text{mg}$  組織の PK で 30 分、 $37^\circ\text{C}$  処理した。Pefabloc で反応を停止後に、DNase I、RNase A 処理を行なった。その後、2-ブタノール/メタノール (5/1) 混合液を加え、 $15,000\text{ rpm}$ 、10 分間遠心して、PrP<sup>Sc</sup> を回収した。

遠心にて回収した沈殿を 1% SDS で  $100^\circ\text{C}$ 、5 分間加熱した後に、1% Zwittergent 3-14、 $150\text{ mM NaCl}$ 、 $50\text{ mM Tris-HCl}$  (pH 8.0) で 5 倍に希釈した後に、PNGase F で  $37^\circ\text{C}$ 、16 時間処理した。メタノール沈殿にて PrP<sup>Sc</sup> を回収し、ウエスタンブロットに供した。

### C 研究結果

オクタペプチドリピート内の配列を認識する mAb110、mAb106、および mAb8 と牛 PrP<sup>Sc</sup>103-121 に対するポリクローナル抗体 B103 のエピトープ解析の結果を図 1 に示した。mAb110 は pepspot 解析から PHGGGGWG (aa87-93) を認識することか判明しているか、このうち PxGxGWx の 4 アミノ酸がエピトープを構成することか、ファージディスプレイによる解析から明らかとなった。aa95-102 には PHGGGGWG と、グリシンが一つ多い配列が存在するか、mAb110 は rBoPrP86-242 と反応するが、rBoPrP9-242 とは反応しないことから PHGGGGWG は mAb110 のエピトープとならないことか判明した。mAb8 は WGQPH (aa62-96) を認識すること、mAb106 が認識する最小の配列は WGQ (aa101-103) であることか pepspot 解析の結果から判明した。mAb106 のエピトープが WGQ を認識することは、本抗体が rBoPrP94-242 と反応するか、rBoPrP103-242 とは反応しないことから、確かめられた。また、B103 のエピトープは免疫原のペプチド配列のうち、図 1 に示すアミノ酸であることか、ファージディスプレイによる解析から明らかとなった。

図 2 に日本の BSE 由来の PrP<sup>Core</sup> と各種抗体の反応性を示した。BSE の PrP<sup>Core</sup> は B103 では検出てくるか、mAb110 および 106 とは反応しなかった。また、PrP<sup>Core</sup> の分子量に顕著な差は認められず、全て 2 糖鎖型が優性であった。従

って、BSE 由来 PrP<sup>Core</sup> は mAb106 のエピトープの C 末端側まで PK により消化されていることか示唆される。

図 3 に羊スクレイピー由来 PrP<sup>Core</sup> と各種抗体の反応性を示した。B103 では供試した全ての検体で PrP<sup>Core</sup> が検出されたか、SB の PrP<sup>Core</sup> は他に比へて分子量が  $2\text{ kDa}$  ほど小さく、mAb110 および mAb106 では検出されなかった。従って、SB の PrP<sup>Core</sup> も BSE のものと同様に mAb106 のエピトープの C 末端側まで PK により消化されていること考えられる。一方 SB 以外のスクレイピーでは mAb110 でも PrP<sup>Core</sup> が検出されることから、mAb110 のエピトープの N 末端側で PK により消化されていることか示唆される。しかし、B103 による検出に比へて、mAb110 および mAb106 による検出では、PrP<sup>Core</sup> のハンドの強度が低下しているものかあることから、mAb110 のエピトープの C 末端側まで消化されている PrP<sup>Core</sup> 分子も存在すると考えられる。

BSE および羊スクレイピー SB の PrP<sup>Core</sup> ともに mAb110 と mAb106 と反応しなかったことから、PNGase F 処理により糖鎖を除去後に PrP<sup>Core</sup> の分子量を比較した (図 4)。SB の PrP<sup>Core</sup> は BSE の PrP<sup>Core</sup> よりも分子量が小さいことか判明した。

### D 考察

PrP<sup>Core</sup> の N 末端の構造を明確にするには、PrP<sup>Core</sup> を精製してアミノ酸配列を決定することか確実であるか、材料に限りのある野外試料に応用するには限界がある。抗体の反応性、分子量、糖鎖型など、比較的容易に、少量の材料でも解析可能な生化学性状により、PrP<sup>Sc</sup> の構造を推定する方法は、PrP<sup>Sc</sup> の型別、ひいてはプリオン株の簡易鑑別法としての利用価値が高い。本研究では、PrP<sup>Core</sup> の分子量ならびに PrP<sup>Core</sup> の PK 切断領域近傍を認識する抗 PrP 抗体の反応性から、PrP<sup>Core</sup> の N 末端の構造に関する情報が得られることを示した。今後、実験動物への伝達性、神経病原性、実験動物における PrP<sup>Core</sup> の変化などを検討して、N 末端の構造と、プリオンの生物性状との関連性を調べる

必要がある。

我々はこれまでに、マウスへの伝達性と PrP<sup>Sc</sup> の PK 抵抗性の違いから、日本に存在する羊スクレイピーを 3 群に分類可能であることを報告してきた。本研究で示した PrP<sup>Core</sup> の N 末端領域の構造を推定する方法を加えると、4 群に分類することが可能となる。

## E 結論

PrP<sup>Sc</sup> の PK 切断領域近傍を認識する抗 PrP 抗体を使用して、日本で発生した BSE および羊スクレイピーの PrP<sup>Core</sup> の N 末端の構造の比較を試みた。使用する抗体としてオクタペプチトリペート中の PHGGGWG を認識する mAb110、WGQ を認識する mAb106、および B103 ポリクローナル抗体を使用した。2003 年 1 月までに日本で発生した BSE6 例の PrP<sup>Core</sup> は全て分子量が同してあった。また、BSE の PrP<sup>Core</sup> は mAb110 および mAb106 と反応しないことから、PK により aa103 の近傍まで消化されていることが示唆された。一方、供試した羊スクレイピー 11 例のうち、SB は PrP<sup>Core</sup> の分子量が 2kDa 程度小さく、SB 由来の PrP<sup>Core</sup> は BSE の PrP<sup>Core</sup> と同様に、mAb110 および mAb106 と反応しなかった。SB 以外の羊スクレイピー由来 PrP<sup>Core</sup> は mAb110 および mAb106 と反応した。以上の結果は、PrP<sup>Sc</sup> の PK 切断領域近傍を認識する mAb110、mAb106、および B103 を使用して PrP<sup>Core</sup> の N 末端の構造の多様性を簡易に識別できることを示している。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Watarai, M, Kim, S, Erdenebaatar, J, Makino, S, Horiuchi, M, Shirahata, T, Sakaguchi, S, and Katamine, S Cellular prion protein promotes Brucella Infection into macrophages *J Exp Med* 198 5-17, 2003
- 2) Okamoto, M, Furuoka, H, Horiuchi, M, Noguchi, T, Hagiwara, K, Muramatsu, Y, Tomonaga, K, Tsuji, M, Ishihara, C, Ikuta, K, and Taniyama, H Experimental Transmission of Abnormal Prion Protein

(PrP<sup>Sc</sup>) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice *Vet Pathol* 40 723-727, 2003

- 3) Kim, C-L, Umetani, A, Matsui, T, Ishiguro, N, Shinagawa, M, and Horiuchi, M Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies *Virology* 320 41-52, 2004
- 4) 堀内基広 抗 PrP 抗体によるプリオン増殖抑制とプリオン病治療の可能性 *最新医学* 58(12) 2802-2808 (2003)
- 5) 堀内基広 牛海綿状脳症問題に関する最近の動向 *老人精神医学* 14 1488-1494 (2003)

### 2 学会発表

- 1) 堀内基広、梅谷 淳、工藤聡子、石黒直隆、横山 隆、品川森一 BSE スクリーニング用 ELISA(ORF ELISA)の開発とその性能評価 第 135 回日本獣医学会
- 2) 大林浩二、堀内基広、石黒直隆、品川森一 プリオン蛋白質と結合するペプチド性リガントの探索 第 135 回日本獣医学会
- 3) 田村勇耕、堀内基広、石黒直隆、古岡秀文、品川森一 尿崩症を誘発するマウス順化スクレイピー株の分離と解析 第 135 回日本獣医学会
- 4) 金チャンラン、品川森一、石黒直隆、堀内基広 抗 PrP 抗体パネルによる正常プリオン蛋白質の細胞内局在マッピング 第 51 回日本ウイルス学会
- 5) 前田秋彦、金チャンラン、田村勇耕、品川森一、堀内基広 オクタペプチトリペートを認識する抗 PrP 抗体による BSE とスクレイピー自然例の識別 第 51 回日本ウイルス学会
- 6) 菊池宏明、品川森一、石黒直隆、堀内基広 プリオン感受性 非感受性細胞の選別 第 51 回日本ウイルス学会

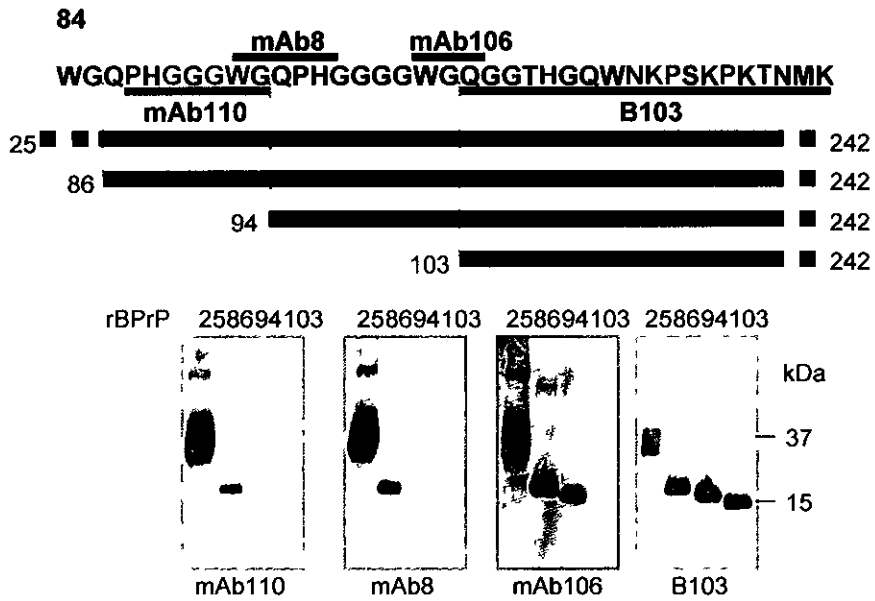


図1 抗PrP抗体のエピトープマッピング。

Pepspot膜による解析(mAb110、mAb106、mAb8)、および免疫に使用した合成ペプチド(B103)から推定されるエピトープを実線(黒)で示した。また、ファーンディスプレイから同定されたエピトープを構成するアミノ酸を赤字で示した。牛組換えPrPaa25-242、aa86-242、aa94-242、aa103-242との反応性をウエスタンブロットにより調べた。

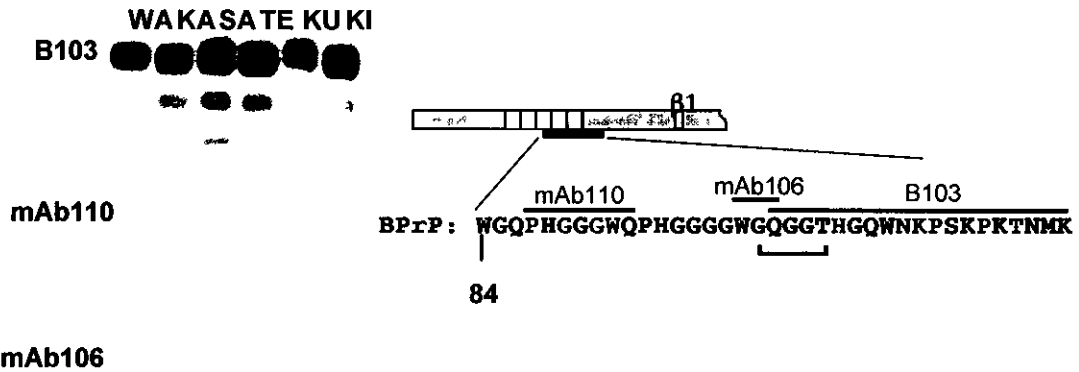


図2 BSE感染牛のPrP<sup>Core</sup>と抗PrP抗体の反応性。

(左) ウエスタンブロット。使用した抗体はパネル左側に示した。(右) 抗体が認識するエピトープ。鍵カノコは予想されるPK切断部位を示す。

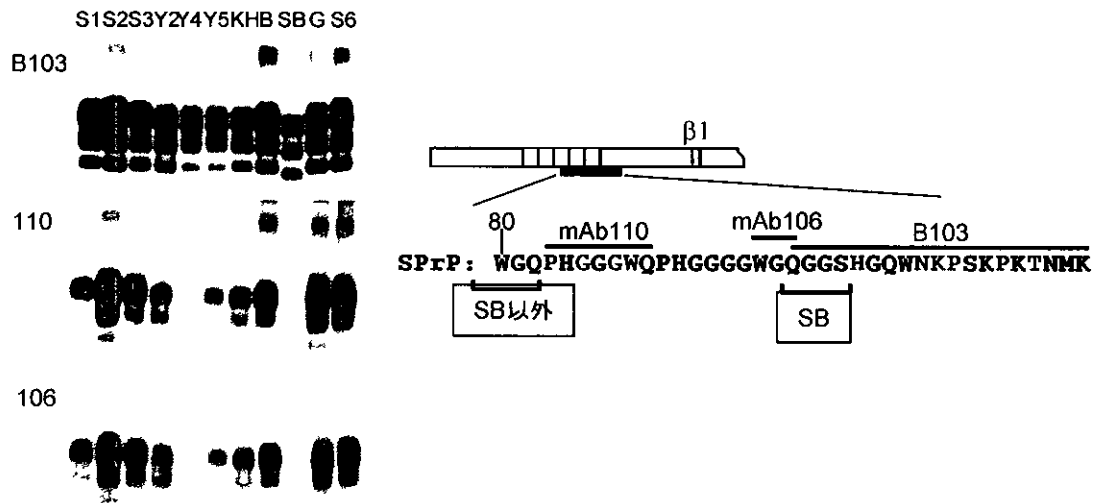


図3 スクレイピー感染羊のPrP<sup>Core</sup>と抗PrP抗体の反応性。  
 (左) ウェスタンブロット。使用した抗体はパネル左側に示した。(右) 抗体が認識するエピトープ。  
 鍵カノコは予想されるPK切断部位を示す。

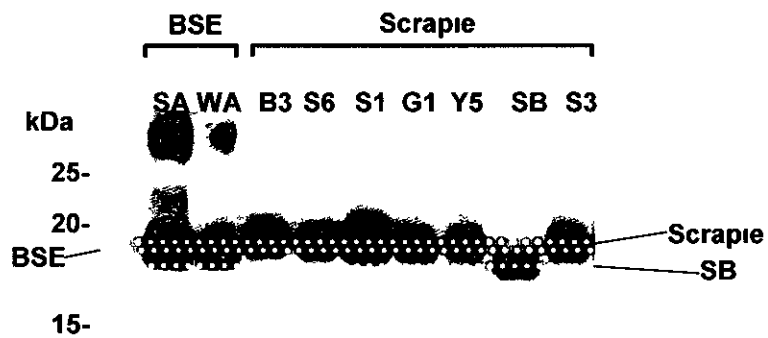


図4 PNGase F処理後のPrP<sup>Core</sup>フラグメント。  
 左2レーンにはBSE感染牛のPrP<sup>Core</sup>、それ以外はスクレイピー羊のPrP<sup>Core</sup>。B103で検出した。