

## 4. 我が国の BSE プリオンの生物学的性状の解析

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  
研究協力者 横山 隆、林 浩子 (同プリオン病研究センター)

研究要旨 BSE プリオンの生物学的性状を明らかにするために、国内初発 (千葉) 例の BSE 脳材料を用いたマウスへの伝達試験を行った。対照として英国由来の BSE プリオンを用いた。プロテイナーゼ K (PK) 処理後の異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) をウエスタンブロット解析したところ、千葉例を接種したマウスでは英国例と類似の糖鎖型および分子量の PrP<sup>Sc</sup> が認められた。PK 消化した PrP<sup>Sc</sup> の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、BSE プリオン感染脳由来 PrP<sup>Sc</sup> の PK 切断部位はスクレイピー Obihiro 株および Sc237 株感染脳に比べて 7 アミノ酸残基以上 C 末端側であることが示された。BSE プリオンの種の壁について検討することを目的として、BSE プリオンおよびマウス継代 BSE プリオンを各種トランスジェニックマウスへ伝達試験を行った。マウス/ハムスターキメラ PrP を有するマウス (MHM2/PrP0/0) はマウスで継代した BSE プリオンに対し高い感受性を示すことが明らかとなった。

### A 研究目的

単一といわれていた牛海綿状脳症状 (BSE) 株が複数に分かれる可能性がでてきた。マウスへの継代に基づき、我が国の BSE の性状および起源の解明が必要となっている。また、BSE プリオンはマウス、ヒツシ、サルへの伝達か認められているか、ハムスターへの伝達は示されていない。マウス/ハムスターキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウスを用いて BSE プリオンの種の壁について検討する。

### B 研究方法

国内発生 (千葉症例) および英国発生の BSE 脳材料を近交系マウスに接種し、伝達性の確認、異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) のウエスタンブロット (WB) による解析を行った。BSE 継代マウス脳より PrP<sup>Sc</sup> のプロテイナーゼ K (PK) 抵抗性断片 (PrP<sup>Core</sup>) を精製し、N 末端のアミノ酸配列を分析した。

また、BSE 脳乳剤、野生型マウス初代および 2 代継代 BSE 試料をウン型、マウス型、ハムスター型およびマウス/ハムスターのキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウスに接種し潜伏期の差異およびマウス脳内に蓄

積する PrP<sup>Sc</sup> の性状について解析する。

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内の BSL3 レベル実験施設にて行い、汚染物は 135°C、30 分間のオートクレーブ処理により不活化した。

### C 研究成果

BSE 千葉例についてマウスへの伝達試験を行った。千葉症例由来 BSE プリオンをマウスで継代した際の潜伏期は初代 409±28 日 (R/III マウス)、2 代 221±47 日 (R/III マウス) または 196±84 日 (ICR マウス)、3 代 174±79 日であった (表 1)。千葉症例と英国症例を接種したマウスでの PrP<sup>Sc</sup> の解析では、両者の間に PrP<sup>Sc</sup> 糖鎖型および PK 消化後の分子量に差は認められなかった (図 1)。しかし、BSE 接種マウスに蓄積した PrP<sup>Core</sup> の非糖鎖修飾断片の分子量はスクレイピー Obihiro 株接種マウスに比べて約 1 kDa 小さかった (図 1)。この特徴はマウスでの継代歴に関わらず保持されていた。BSE を 2 代継代したマウス脳から PrP<sup>Core</sup> を精製し、N 末端アミノ酸配列分析を行った。Obihiro 株、ハムスター馴化スクレイピー Sc237 株ではマウス PrP のアミノ酸配列 81, 85, 89 (ハムスター PrP82 86,

90) か N 末端として検出された。PrPcore は異なる N 末端を有する分子の集合体であると考えられた。BSE 継代マウス由来 PrPcore の N 末端は PrP96, 97 であり、Obihiro 株、Sc237 株に比べて 7 アミノ酸以上 C 末側まで PK 消化されることか示された (図 2)。

マウスで継代した BSE プリオンを脳内接種した MHM2/PrP0/0 マウスの潜伏期は、マウスで 1 代継代した BSE プリオン 134±10 日、2 代継代後の BSE プリオン 122±5.5 日であった。Obihiro 株を接種した MHM2/PrP0/0 マウスは 159±7.4 日で発症が認められ、マウス継代 BSE プリオンは MHM2 マウスに高い感受性を有すると考えられた。一方、tga20 マウス(マウス PrP を過発現したマウス)での BSE プリオンの潜伏期は 125±3.1 日 (2 代継代後)であったか、Obihiro 株を接種した tga20 マウスは 78±2.9 日で発症が認められた (表 2)。これらのマウスに蓄積した PrP<sup>Sc</sup> を WB で解析したところ、BSE 由来材料を接種したトランスジェニックマウスの PrP<sup>Sc</sup> は、野生型マウスと同様の PrP<sup>Sc</sup> 糖鎖型および PrPcore の分子量が認められた (図 3)。

#### D 考察

WB による解析では、千葉例由来と英国例由来の PrP<sup>Sc</sup> には差が認められなかったことから、千葉例の BSE プリオンは英国例由来の BSE プリオンと同様の性状を示すと考えられた。

BSE 接種マウス由来 PrP<sup>Sc</sup> の PK 切断部位は スレイピー Obihiro 株接種マウスに比べて少なくとも 7 アミノ酸残基以上 C 末端側であることか示された。この PK 消化後の N 末端の差が WB における非糖鎖修飾断片の分子量の差を反映していることか明らかとなった。

MHM2PrP0/0 マウスはマウス継代 BSE プリオンに対し高い感受性を示した。BSE 由来の PrP<sup>Sc</sup> が MHM2 型 PrP<sup>C</sup> を効率よく変換する可能性が示唆された。

国内のその他の BSE 例 (和歌山症例、神奈川症例) についても野生型および各種トランスジェニックマウスに接種し、経過観察中

ある。また、茨城症例 ([非定型 BSE]) についてはウシ PrP 過発現トランスジェニックマウスへの伝達試験を行っている。

#### E 結論

PrP<sup>Sc</sup> の性状解析の結果、BSE 国内初発例と英国 BSE 症例の類似性が明らかとなった。

#### F 健康危険情報

特になし。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Serjmyadag D, Byambaa B, Shinagawa M Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep J Vet Med Sci 65 75-81, 2003
- 2) Gombojav A, Shimauchi I, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, Kitamoto T, Miyoshi I, Mori S, Takata M Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie J Vet Med Sci 65 341-347, 2003
- 3) Kim CL, Umetani A, Matsui T, Ishiguro N, Shinagawa M, Horiuchi M Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies Virology (in press)

##### 2 学会発表

林 浩子、岩丸祥史、高田益宏、牛木祐子、今村守一、横山 隆、品川森一 異常プリオン蛋白質のコア断片 (PrPcore) 形成におけるプロテイナーゼ K 切断点の多様性 第 51 回日本ウイルス学会学術集会 2003 年 10 月 (京都)

表1 BSEプリオンを脳内接種したマウスの潜伏期

Inoculum	Mouse breed	passage history	Incubation periods (days) (AV±SD)
BSE-Chiba	RⅢ	1 <sup>st</sup>	409 ± 28.2
BSE-UK	RⅢ	1 <sup>st</sup>	467 ± 99.2
1 <sup>st</sup> (Chiba)	RⅢ	2 <sup>nd</sup>	221 ± 4.7
1 <sup>st</sup> (Chiba)	ICR	2 <sup>nd</sup>	196 ± 8.4
2 <sup>nd</sup> (ICR)	ICR	3 <sup>rd</sup>	174 ± 7.9

図1 BSE発症牛および初代継代マウスの脳に蓄積したPrP<sup>Sc</sup>

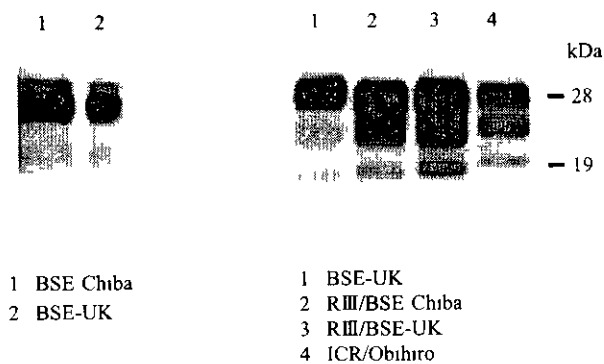


図2 マウス継代BSEのPrP<sub>core</sub>のN末端

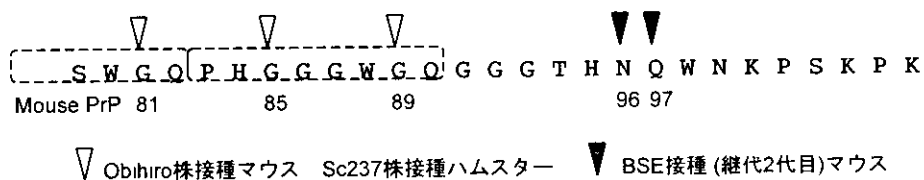
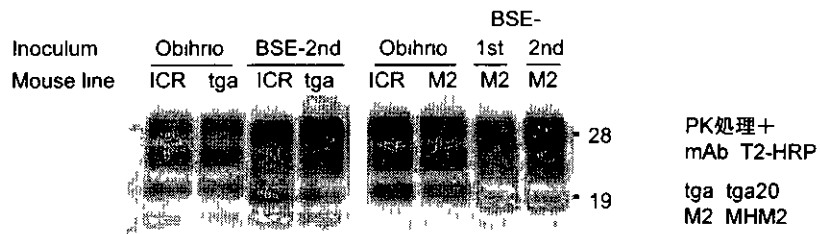


表2 BSEプリオンを脳内接種したトランスジェニックマウスの潜伏期

Mouse line	Inoculum			
	Obihro	BSE	BSE-1st	BSE-2nd
ICR	150 ± 2.5*	(409 ± 28.2)**	197 ± 8.4	197 ± 8.4
tga20	78 ± 2.9	>240***	>150	125 ± 3.1
MHM2	159 ± 7.4	>240	134 ± 10.0	122 ± 5.5
MH2M	196 ± 8.4	>240	>150	>150

\* AV±SD (days)    \*\* RⅢマウスでの潜伏期間    \*\*\* 未発症 (経過観察中)

図3 BSEプリオンを接種したトランスジェニックマウス脳内のPrP<sup>Sc</sup>



## 5. 異常型プリオンタンパク質の生化学的検出

### —全頭検査で発見された非定型的 BSE プリオンタンパクの性状—

分担研究者 山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部室長  
研究協力者 萩原 健一、納富 香子、中村 優子、  
大内 史子（同細胞化学部）

研究要旨 厚生労働省が実施している牛の全頭検査で発見された従来の BSE プリオンと異なるウエスタンブロット像を示すプロテアーゼ抵抗性 BSE プリオン、いわゆる非定型プリオンタンパク (atypical BSE prion) の生化学的性状について検討した。その結果、今回発見された非定型 BSE プリオン (茨城例) は

- 1 従来型の BSE プリオンに比して 2 糖鎖型分子の相対含量が 20%程低下しており、その分、非糖鎖型分子の相対含量が増加している事、
- 2 非糖鎖型分子の分子量が従来型のそれより若干 [1000-2000 タルトン程度] 小さい事、
- 3 プロテイナーゼ K に対する抵抗性は従来型より弱い事

などの点で従来の BSE プリオンとは異なっていた。

一方、当該ウシ (ホルスタイン、去勢ウシ、23 か月齢) のプリオンタンパク遺伝子に変異は認められず、非定型 BSE プリオンは従来型とは異なる高次構造を持つプリオンタンパクの構造異性体、即ち、新たな BSE 株であることが示唆された。

#### A 研究目的

BSE は極めて近似した生化学的性状を持つ単一の“株”により伝播されていると考えられているか、平成 15 年 9 月に当研所におけるウエスタンブロット法 (WB 法) での確定診断で従来型の BSE プリオンと異なるウエスタンブロット像を示すプロテアーゼ抵抗性 BSE プリオンタンパク質が発見された (茨城例)。同時期に従来型と異なる性状を示す BSE プリオンタンパク質の存在がイタリア、フランスからも報告された。特に、イタリア例は WB の泳動像のみならず、免疫染色においても異常型プリオンのアミロイド斑が嗅球の白質部に多く認められる点で従来の BSE プリオンとは明らかに区別される新規の BSE 株であることを強く示唆するものである。

本研究では我が国で発見された非定形 BSE プリオン (茨城例) についてその糖鎖型、PK 抵抗性等の生化学的性状を従来型の BSE プリオンタンパク質と比較検討した。

#### B 研究方法

試料の調整 食肉衛生検査所において採取された 20%乳剤及び、当所で新たに切り出した門部隣接部位の 20%乳剤をもちいた。乳剤は安井機械のマルチヒーノスジョノカー、ニノカト一製の直径 1mm のタンクステンヒース (200mg) を用いて 2000rpm 回転、5 分の処理で調整した。

酵素消化 組織乳剤は検査プロトコールに従って、コラーゲナーゼ、プロテイナーゼ K (PK) 及び Dnase I で順次消化した。なお、消化に先立って、反応液に 5%の 2-Butanol を加えて超音波処理をしておくこと PrP<sup>Sc</sup> の同定の妨げとなる PrP<sup>C</sup> の切れ残りを減らすことかできる。PK 2 回法では、PK 処理後 BuOH-MeOH 沈殿物を 0.2ml の detergent buffer に再懸濁して PK を 5µg/ml として 37°C 20 分消化した。

糖鎖の除去 SDS 用のサンプルハノファーに溶解した試料を試葉キントに添付の緩衝液で約 10 倍希釈し、PNGaseF (Bio Labs) で 37°C 1 時間処理して糖鎖を除去した。

リンタンクステン沈殿 BuOH-MeOH 沈殿した PK 消化試料を、0.2ml の 2%サルコンル/PBS に懸濁し、4%リンタンクステン酸溶液 15 $\mu$ l [終濃度 0.3%] を加えて 37°C 30 分震盪し、生じた沈殿を遠心 (15000rpm, 30min) により集め、20 $\mu$ l の SDS-Buffer に溶解して泳動した。

電気泳動/WB 概ね、検査プロトコールに準拠して行なった。

抗体 1次抗体 (抗プリオン抗体) は帯広畜産大学で作成したモノクローン抗体 44B1 (マウス) を 1 $\mu$ g/ml 濃度で使用した。

定量 ECL 発色フィルムをスキナーで取り込み、画像を NIH-Image ソフトウェアで数値化、定量した。このとき、同時に泳動、発色させたマウスプリオンタンパクの発色の程度を比較することにより、ケル間のハラツキを補正した。

## プリオン蛋白質遺伝子 (PRNP) の DNA 塩基配列分析

ウシ組織から Genomic-tip 20/G (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を分離精製し、プライマー A

(5'TGCTGGCATTCTACATTTATCAAGTTA-3') と B (5'-AAGCGCCAAGGGTATTAGCATAC-3') ならびに Easy-A™ High Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) を用いた PCR により、ウシ・プリオン蛋白質コート領域全長を含む 2 本鎖 DNA を得た。この PCR 産物についてプライマー A および B を用いた非対称 PCR を行うことで 1 本鎖 DNA を調製し、BigDye (PerkinElmer/Applied Biosystems) による DNA 塩基配列分析に供した。

## C 結果

### 1 BSE 罹患ウシのプリオンタンパク質遺伝子の解析

図-1 に当所で確認検査を行なったウシ 8 頭 (BSE4 頭、正常 3 頭、判定保留例 1) のプリオンタンパク質の DNA の塩基配列の比較を記した。何れのウシもオクタリピートは 6/6 個型であり、個体により 234 位及び 579 位に夫々、G/A, C/T の塩基置換 (多型) が認められた。こ

れらは N-末端から 78 番目の Gln 及び 192 番目の Asn をアミノ酸をコートしているコトンの一部であるか、アミノ酸の変異をもたらすことの無い silent mutation である。すなわち、このような多形と BSE の発症とは無関係であり、また、若齢で異常型プリオンを蓄積していたウシ、#69 [茨城例]、#71 [広島例] についても上記の多型以外には遺伝子に変化は認められず、これら 2 頭が若齢での異常型プリオンの蓄積もプリオンタンパクの遺伝的変異によるものでは無いことが判った。

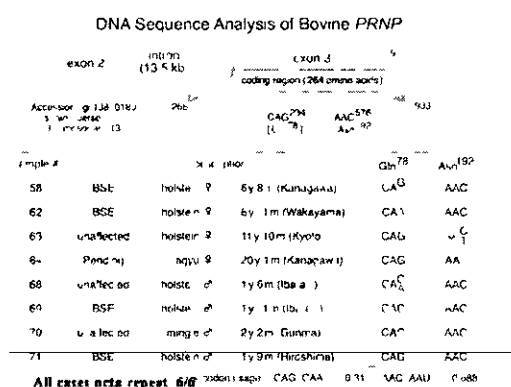


図-1 プリオンタンパク質遺伝子の塩基配列の分析

### 2 #69 茨城例で検出された非定型プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパクの生化学的特徴

図-2 に確定検査で得られた非定型プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパクの WB 像を示した。延髄試料では 1 次検査の残り試料について PK 抵抗性プリオンのハントが認められたか (左から 4, 5 番目レーン)、当所で門部隣接部位から調整した試料ではそのようなハントは検出されず (左から 6, 7, 8, 9)、異常型プリオンは主に門部に局在しているものと思われた。発色の程度から考えて、PK 抵抗性プリオンタンパクの蓄積量は和歌山、神奈川例と比較して 1/400 と極めて少ないか 1-2 糖鎖型分子の含量が低下していること及び 2-非糖鎖型分子が若干速く泳動している、すなわち非糖鎖型分子の分子量が若干小さいこと特徴的である。これらの生化学的特徴の違いは従来と異なる BSE プリオン株の存在を強く示唆するものであった。

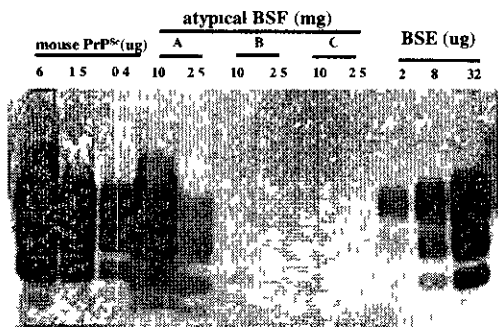


図-2 非定形BSEプリオン（茨城例）のWB  
A ELISA残り B C 新規切り出し部位

### 3 PK 抵抗性プリオンの生化学的性状

前記の非定形 BSE プリオンが異常型プリオンの特異的沈殿法であるリンタンクステン酸で沈殿するか否か、及び PK 分解に対してどの程度の安定性を示すかについて検討した結果を図-3 にしめた。

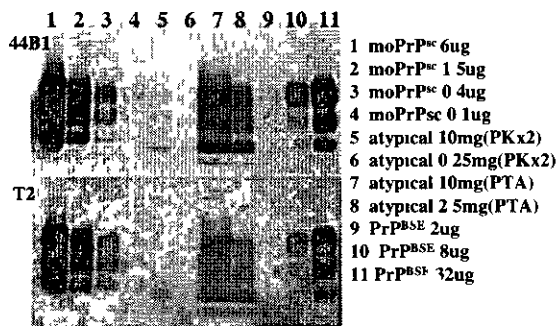


図-3 非定形BSEプリオンのリンタンクステン酸(PTA)による沈殿とPK 2回処理による分解

その結果、非定形 BSE プリオンはリンタンクステン酸で沈殿して沈殿部分に回収（レーン左から 7 8 番目）され異常型プリオンの性質を保持しているか、PK で再処理することにより殆ど分解されており（レーン左から 5 6 番目）、従来の BSE プリオンと比べて PK 抵抗性は弱いことか判った。抗原認識部位が 44B1 と異なる mAbT2 を 1 次抗体とした場合も同様な結果が得られており、これらのハントがプリオンタンパク質由来であることか確認された。（図 3-b）

### 4 糖鎖除去による電気泳動的不均一性の消失

ウェスタンブロット上で異常型プリオンが示す特徴的な 3 本のハントは 2 糖鎖型、1 糖鎖型及び非糖鎖型の分子種の存在によるものであり、適当な糖鎖除去酵素（peptide N-glycosidase）の作用で全ての分子が非糖鎖型

となり、不均一性が解消されることか知られている。非定形プリオンにおける電気泳動的不均一性が従来型の BSE プリオンと同様に糖鎖付加分子の存在によるものであるか否かを知ることを目的として peptide N-glycosidase による糖鎖除去を試みた。その結果、図-4 に示すように非定形プリオンの電気泳動的不均一性は peptide N-glycosidase 処理で解消され（レーン 7）、不均一性の原因が糖鎖に依存している事か証明された。

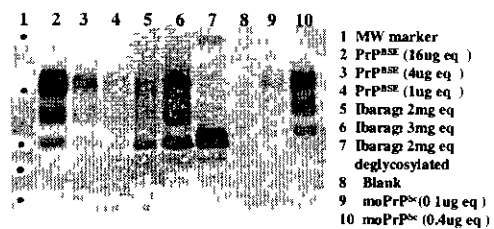


図-4 非定形BSEプリオンの糖鎖除去

### 5 非定形 BSE プリオンの糖鎖型

BSE を伝播する異常型プリオンの糖鎖型は 2 糖鎖型分子、1 糖鎖型分子及び非糖鎖型分子の相対含量がそれぞれ約 70%、20%、10%を示すことか知られている。一方、図-1, 2 示した様に茨城例では従来型の BSE プリオンに比して 2 糖鎖型の含量が明らかに減少していると思われる WB 像が得られている。表-1 に従来型及び非定形 BSE プリオンの糖鎖型含量を定量して比較した結果を記した。従来型（和歌山例）は文献値に近い相対含量を示したか、非定形例では 2 糖鎖型の含量が 20%程度低下し、その分非糖鎖型分子の含量が増加していることか明らかである。

表-1 非定形BSEプリオンと従来型BSEプリオンの糖鎖型の比較

	従来型BSE (BSE 和歌山)	非定形BSE (BSE 茨城)
2糖鎖型	69.3%	47.6%
1糖鎖型	23.2%	26.5%
非糖鎖型	7.5%	25.9%

D/E 考察/結論

今回発見された非定型的 BSE プリオン（茨城例）は 1 従来型の BSE プリオンに比して 2 糖鎖型分子の相対含量が 20%程低下しており、その分、非糖鎖型分子の相対含量が増加している。2 非糖鎖型分子の分子量が従来型のそれより若干〔1000-2000 タルトン程度〕小さい。3 プロテイナーゼ K に対する抵抗性は従来型より弱い事などの点で従来型の BSE プリオンとは異なっており新規 BSE プリオン株である可能性が示唆された。また、非定型的 BSE プリオンは 23 ヶ月齢の若齢ウシに蓄積されていたか、プリオン遺伝子は正常なアミノ酸配列をコードしており、若齢での蓄積の原因がヒト GSS に見られる様な遺伝的素因であることは考えがたい。

我々の発見に前後して、イタリア及びフランスから従来型の BSE プリオンと異なる性質を持つ非定形 BSE プリオンの存在が報告されている。（表-2）

表-2 報告された非定形 BSE プリオンの比較

	日本 <sup>1)</sup>	イタリア <sup>2)</sup>	フランス <sup>3)</sup>
頻度	(1/8)	(2/8)	(3/58)
2糖鎖型分子の含量(WB)	減少	減少	減少
非糖鎖型分子の分子量(WB)	小さい	小さい	大きい
PrP <sup>sc</sup> の蓄積様式(IHC)	検出せず	アミロイド	not done

1) Y Yamakawa et al. *Jan. J Infect. Dis* 56 2003  
 2) Casalons C et al. *PNAS* 101 2004 3065 3070  
 3) A G Giacoba et al., *EMBO report* 2004 1 4

これらの非定形 BSE プリオンは 2 糖鎖型分子種の含量が減少している点で共通の性質を示すか、非糖鎖型分子種の分子量が日本、イタリア例では従来型より小さく、フランス例では逆に大きいと報告されており、それらの異同については今後の研究に待たねばならない。

イタリア例では異常型プリオンの蓄積様式がアミロイド型で蓄積部位も従来型 BSE が蓄積する脳幹部に少なく、嗅球の白質部に蓄積が見られる点で、免疫組織化学的にも新型の BSE プリオンである可能性が極めて高い。

このように従来と異なる性質を持つ異常型プリオンか感染性を示すか否かについては不明であるか、日本例については本研究班の松田博士が作成したウシプリオン発現 Tg マウスに接種して経過を観察中である。

F 健康危険情報

特記事項無し

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Oishi T, Hagiwara K, Kinumi T, Yamakawa Y, Nishizima M, Nakamura K, Arimoto H Effects of b-sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP(81-145) *Org Biomol Chem* 2003, 1 2626-2629
- 2) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishizima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T Atypical Protease Resistant Prion Protein (PrP<sup>res</sup>) observed in an apparently healthy 23month Old Holstein Sterer *Jpn J Infect Dis* 2003, 56 221-223

2 学会発表

- 1) Nakamura Y, Hagiwara K, Ohuchi F, Nohtomi K, Nishizima M, Yamakawa Y A Synthetic Peptide Fragment from Prion Protein Inhibits the Accumulation of Proteinase K Resistant Prion Protein 第 76 会日本生化学会大会（京都）2003, 10
- 2) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nishizima M, Nohtomi K, Sata T Tissue distribution of Protease Resistant Prion Protein in Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) using Western Blotting Assay 第 76 会日本生化学会大会（京都）2003, 10

H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 無し
- 2 実用新案登録 無し
- 3 その他 無し



## 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

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作出を行ってきた。細胞融合から得られたモノクローナル抗体 HUNNI のウンBSE サンプルに対する反応性を確認し、免疫組織化学染色においても各種プリオン病検体に対して有用であることが示された。また、単鎖型遺伝子組換え抗体 (scFv 抗体) ライブラリーから選抜した *phAb3-15* の TAG 付加組換え 2 価抗体を真核細胞発現により調製し、scFv 型抗体と比較してウンBSE サンプルに対し著しく高い反応性を有することを確認した。今年度の結果から、これまでに作製したニワトリ抗プリオン抗体が BSE サンプルに対しても反応性を有すること、scFv 抗体を含む全てのニワトリモノクローナル抗体の組換え 2 価抗体化が可能であることが示された。今後、さらに有用なニワトリ抗体を作製し実用化することにより高感度プリオン検出系に応用できると考えられる。

### 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相同性は約 40%と極めて低いことから、ニワトリはほ乳動物プリオンに特異的な抗体の作出に有効な免疫動物であると考えられた。事実、当研究室ではプリオン免疫ニワトリ脾臓細胞から、細胞融合法により抗プリオンモノクローナル抗体、ファージディスプレイ法により抗プリオン scFv 型抗体を作出してきた。これまでに得られたニワトリ抗プリオン抗体は、ほ乳動物プリオンタンパクを幅広く認識し、ウェスタンブロッティングにおいて非特異反応が極めて少ないという優れた特性を有していた。そこで本研究では、既存抗体の BSE サンプルに対する反応性を測定すると共に、遺伝子工学的手法を用いたプリオン病診断に応用可能な組換え抗体の作出を目的とした。

### B 研究方法

【供試抗体】当研究室で細胞融合法により作製した既存の抗プリオンモノクローナル抗体 HUNNI と、ファージディスプレイ法により選抜した既存の scFv 型抗体 *phAb3-15* をプリオン検出抗体として用いた。両抗体はマウスプリオンタンパクのプロテアーゼ K (PK) 抵抗性領域の 98-110 アミノ酸残基を認識することを確認

している。*phAb3-15* 抗体 V 領域重鎖 ( $V_H$ ) 遺伝子と抗体 V 領域軽鎖 ( $V_L$ ) 遺伝子を増幅・精製し、各々の C 末に抗体 C 領域遺伝子 ( $C_H$ ,  $C_L$ ) を付加する様に設計した H 鎖発現ヘクター、L 鎖発現ヘクターに組み込んだ。なお H 鎖発現ヘクターには抗体精製用に 6×His 配列を  $C_H$  の C 末に組み込んだ。両発現ヘクターを CHO 細胞にトランスフェクションし 2 価抗体安定発現クローンを選抜した。

【供試サンプル】BSE サンプルは国立感染症研究所佐多博士より分与された小脳ホモンネート (Kanagawa) を使用した。マウス異常型プリオンは動物衛生研究所横山博士より分与されたスクレイピー (Obihiro 株) 感染マウスの脳ホモンネートを使用した。

【ウェスタンブロッティング】ウェスタンブロッティング用サンプルは、脳ホモンネートを PK (20  $\mu$ g/ml) で 37°C, 40 min 処理後、100,000g で 60 min 遠心して調製した。各種ニワトリ抗体 (陽性対照抗体として 6H4) を用いて 1 次抗体反応、HRPO-anti-chicken IgG (H+L) を用いて 2 次抗体反応を行った後、ECL plus を用いてノクナルを検出した。

【免疫組織化学染色】各種プリオン病検体の免疫組織化学染色は佐多博士に依頼した。

## C 研究結果

【HUNN1 モノクローナル抗体】 ウェスタンブロッティングの結果、HUNN1 は 6H4 と比較してマウス、ウシの異常型プリオンを同等以上の感度で検出可能であった。また、露光時間を伸ばした時、6H4 では非特異シグナルが現れるのに対し HUNN1 ではほとんど非特異反応は認められなかった。今回用いた HUNN1 はハイブリトーマ培養上清で抗体濃度は約 2 $\mu$ g/ml であり、今後遺伝子組換え型 HUNN1 を作製し添加抗体濃度を高めることで、より高感度に検出可能となると考えられる。

免疫組織化学染色の結果、HUNN1 は BSE 検体に対しては反応性が弱く、CJD、GSS およびリスサルスクレイピー検体に対しては強い陽性反応を示した。HUNN1 はマウスプリオンを抗原として得られた抗体であり、今後、ウシプリオンを標的として抗体作製を行うことで BSE とも良く反応するニワトリ抗体も得られるであろう。

【CHO 発現 3-15 2 価抗体】 scFv 型抗体 *phAb3-15* を 2 価抗体化して CHO 細胞に発現させることに成功した。培養上清中の抗体濃度は 2 $\mu$ g/ml であった。ウェスタンブロッティングの結果、今回作製した 2 価抗体は scFv 抗体と比較して正常型プリオン、異常型プリオンに対し著しく高い反応性を示した。今回使用した 2 価抗体は静置培養した CHO の培養上清であり、今後発現抗体をアフィニティークロマトグラフィーで精製することか可能である。我々は scFv 型抗体を用いたウェスタンブロッティングで、高濃度の精製抗体を用いた条件で検出感度が大きく上昇することを経験していることから、2 価抗体に関しても同様に検出感度を上げることも出来ると考えている。また *phAb3-15* 以外の scFv 型抗体、さらには HUNN1 等のモノクローナル抗体についても 2 価抗体が作製可能であり、大幅な検出感度上昇が見込まれる。

## D 結論

scFv 型につつき 2 価抗体型の遺伝子組換え型ニワトリ抗プリオンモノクローナル抗体が作製可能となり、精製抗体の大量生産への道が

開かれた。今後 BSE に対してより高い反応性を有する抗体も作出可能である。次年度は、研究室への抗体提供も可能となることから、班研究への一層の協力体制を構築して行きたい。

## E 健康危険情報

特に問題は無かった。

## F 研究発表

- 1) Nakamura, N, Shimokawa, M, Miyamoto, K, Hojyo, S, Horiuchi, H, Furusawa, F and Matsuda, H Two expression vectors for the phage-displayed chicken monoclonal antibody J Immunol Methods, 280 157-164, 2003
- 2) Nakamura, N, Miyamoto, K, Shimokawa, M, Nishida, N, Mohri, S, Kitamoto, T, Horiuchi, H, Furusawa, S and Matsuda, H Generation of antibodies against prion protein by scrapie-infected cell immunization of PrP0/0 mice Hybridoma and Hybridomics, 22(4) 263-266, 2003

## 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

分担研究者 千葉 丈 東京理科大学基礎工学部教授  
研究協力者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部  
山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部

研究要旨 ウンのプリオンタンパク質 (BoPrP<sup>c</sup>) をコートする遺伝子を組み込んだプラスミドを、プリオンタンパク質をノックアウトしたマウスに直接投与して遺伝子 (DNA) 免疫を行った。種を越えてプリオンタンパク質に反応する力価が非常に高い抗血清を作製してきた。この抗血清 (ポリクローナル抗体) はマウス神経細胞の細胞膜プリオンタンパク質と強く結合し、高親和性であることが示唆された。また、この抗血清を用いた和歌山例の BSE 牛の上部頸髄標本の免疫染色で、灰白質の BoPrP<sup>sc</sup> が粗大顆粒状に染色された。遺伝子免疫法を用いて、正しい立体構造をとっている正常型プリオンタンパク質を認識できる抗体だけでなく、変異型プリオンタンパク質の検出にも有用なポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製できるものと思われる。

### A 研究目的

これまでプリオンタンパク質に対する様々な抗体が作製され、正常型および異常型プリオンタンパク質の検出に用いられている(1)。本研究では、これまでに調製され、かつ一般に入手できる抗体よりも親和性が高い抗体を、我々の確立した遺伝子 (DNA) 免疫法を用いて調製することを目的とする。これまでに作製されたほとんどの抗体は、大腸菌で発現させて精製した組換えプリオンタンパク質やプリオンタンパク質のアミノ酸配列の一部を合成したペプチドを抗原として調製されている。プリオンタンパク質の機能は依然不明であるか、プリオンタンパク質は糖鎖修飾されている細胞膜タンパク質であり、プリオンタンパク質の立体構造の形成と維持には糖鎖修飾が必須であると考えられている。大腸菌を用いて調製したプリオンタンパク質を抗原として免疫した動物で産生されたこれまでの抗体レパートリーには、立体構造を認識する抗体はほとんど含まれていない可能性がある。また、合成ペプチドを抗原とした場合にも、立体構造を認識する抗体が得られる可能性は低い。プリオンタンパク質をコートする遺伝子を組

み込んだプラスミドを動物に投与して抗体応答を誘導する遺伝子 (DNA) 免疫では、生体内で発現し、糖鎖修飾されて正しい立体構造をとっているプリオンタンパク質を認識できる抗体が産生される可能性が高い。このような抗体レパートリーの中から、これまでの抗体の認識するエピトープとは異なるエピトープを認識する抗体で、プリオンタンパク質の検出系の高感度化に有用な抗体をモノクローナル抗体として調製することを最終目的とする。

### B 研究方法

PrP<sup>c</sup> ノックアウトマウスは共同研究者の東京大学小野寺 節博士および国立感染症研究所松田潤一郎博士より供与された。ウン (ホルスタイン) プリオンタンパク質 (BoPrP<sup>c</sup>) をコートする遺伝子は共同研究者の国立感染症研究所の高橋秀宗博士より供与された。BoPrP<sup>c</sup> 遺伝子を遺伝子免疫用ヘクターに組み込み、我々の開発したプロトコールにより PrP<sup>c</sup> ノックアウトの筋肉に直接投与して遺伝子免疫を行った。プリオンタンパク質に対する抗体は、大腸菌を用いて調製されたウン、

マウス、ヒトの組み換えプリオンタンパク質を用いた ELISA およびウエスタンブロットで検出 定量した。また、遺伝子免疫により、糖鎖修飾されて正しい立体構造をとっている HuPrP<sup>c</sup> を認識できる抗体が産生されているかを調べるために、マウス神経細胞株を用いた FACS 解析を行った。さらに、遺伝子免疫によって誘導された抗体レパトリーに、ウン変異型プリオンタンパク質 (BoPrP<sup>sc</sup>) に反応する抗体が十分に誘導できているかを調べる目的で、和歌山例の BSE 牛の上部頸髄標本を用いて免疫染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

マウスの取り扱いや動物保護に配慮し、東京理科大学実験動物委員会規定を遵守して行われた。

#### C 研究結果

BoPrP<sup>c</sup> をコートする遺伝子を組み込んだプラスミドで免疫された PrP<sup>c</sup> ノックアウトマウスの血清に、種を越えてプリオンタンパク質に反応する力価が非常に高い抗プリオンタンパク質抗体が証明された。この抗血清 (ポリクローナル抗体) がマウス神経細胞の細胞膜プリオンタンパク質と強く結合することから FACS 解析の結果明らかになり、コントロールの 6H4 モノクローナル抗体よりも高親和性の抗体産生クローンが誘導されていることが示唆された。また、この抗血清を用いた和歌山例の BSE 牛の上部頸髄標本の免疫染色で、灰白質の BoPrP<sup>sc</sup> が粗大顆粒状に染色されて検出された (図 1)。

#### D 考察

遺伝子免疫法を用いて PrP<sup>c</sup> に対する強い抗体応答を PrP<sup>c</sup> ノックアウトマウスに誘導することかできた。その抗血清に含まれる抗体がマウス神経細胞の細胞表面プリオンタンパク質に強く結合し、同時に、BSE 牛のホルマリノ処理をされた上部頸髄標本の変異型プリオンタンパク質にも反応することか明らかになったことから、BoPrP<sup>c</sup> をコートする遺伝子を

組み込んだプラスミドを用いた遺伝子免疫によって、正しい立体構造をとっている正常型プリオンタンパク質を認識できる抗体だけでなく変異型プリオンタンパク質の検出に有用なポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製できるものと思われる。

#### E 結論

BoPrP<sup>c</sup> をコートする遺伝子を組み込んだプラスミドを用いた遺伝子免疫によって、プリオンタンパク質の検出系の高感度化に有用な抗体を作製できると思われる。

#### F 健康危機情報

特になし。

#### G 研究発表

- 1 論文発表  
なし。

#### H 文献

MacGregor I (2001) Prion protein and developments in its detection *Transfus Med* 11(1) 3-14



図 1 BSE 牛 (和歌山例) の上部頸髄標本の免疫染色。BoPrP<sup>c</sup> をコートする遺伝子を組み込んだプラスミドを用いた遺伝子免疫で調製されたマウス血清によって、灰白質の BoPrP<sup>sc</sup> が粗大顆粒状に検出された。

## 8. プリオン病の診断技術の開発に関する研究

分担研究者 田村 守 北海道大学電子科学研究所教授

研究要旨 小型・安価な蛍光相関分光法（FCS）装置を開発した。FCS に適した検出原理を考案した。これは、別の抗原抗体反応への応用も可能である。小型 FCS を用いて牛組換えプリオン蛋白質を検出してきた。検出限界値は現在のところ数 10nM である。今後は、脳乳剤を含んだ試料を用いて検討する。全自動化システムの構築に向け、分注器と流路型セルを組み合わせる予定。

### A 研究目的

蛍光相関分光法（FCS Fluorescence Correlation Spectroscopy）は、蛍光強度のゆらきを解析し、そのゆらきに関わる物理量を得ようとする方法である。側定では、共焦点光学系を用いることにより、試料の微小領域（体積  $\sim 10^{-16}l$ ）からの蛍光を検出できる。この領域は開放系であるため、分子が領域内を出入りし、分子数にゆらきを生ずる。結果、蛍光強度は領域内の分子数の増減を反映したランダムなゆらきとして観測される。これを解析し、分子の数と大きさに関する情報を得ることか出来る。FCS では分子に関する情報を実時間で分離精製を経ずに分析することか可能であるため、膨大な試料からの微量な標的分子のスクリーニングに適している。

本研究では、北海道大学・電子科学研究所で研究開発を行ってきた FCS を抗原抗体反応に拡張し、異常型プリオン蛋白質の検出技術を確認する。最終的には、多検体の病態検出か可能な全自動化システムを構築することを目的としている。

今回は、新たに開発した小型 FCS を用いて、プリオン蛋白質を検出することを目的とした。

### B 研究方法

現在市販されているカールツァイス社製の FCS は大型かつ高価であるため、食肉衛生検査所や家畜保健衛生所への設置は困難である。そこで、浜松ホトニクスと共同で小型かつ安価な FCS 装置を開発した。

FCS を用いた抗原の有無の判定は、蛍光標識した抗体か抗原を捕捉することによって分子量が増し、それに伴って拡散時間が増加することを利用してしている。しかしながら、標識抗体と抗原の分子量に顕著な差がない場合（プリオン蛋白質の分子量は抗体の 1/5 倍）、拡散時間に差が生じない。そこで、新たな検出原理を考案し、検討した（特許出願予定のため、詳細は記述せず）。

試料は、N101（日本油脂）でフロノキック処理した 384 穴プレート（オリンパス）に、蛍光標識した抗プリオン抗体（富士レヒオ社製）と牛組換えプリオン蛋白質（富士レヒオ社製、以下 rPrP）を加え、室温で 1 時間放置した。側定では、フロノキック処理した 8 穴プレート（NUNC）に試料を移し替え、小型 FCS を用いて側定した。側定時のレーザーパワーは  $175\mu W$  とし、3 秒間×10 回の側定を行った。デンタル相関器（浜松ホトニクス社製）によって記録解析が行われ得られた自己相関関数に関し、付属のフレンジックソフト（浜松ホトニクス社製）で拡散時間をはじめとする各パラメータを導いた。

### C 研究結果

小型 FCS 装置は、主に LED 励起固体レーザー（波長 532nm）、対物レンズ（UApo40X W/340、オリンパス）そして高検出効率フォトンカウンティングヘッドから成る。外部にマイクロメーターホックス フィルタホックスか装備され、ステーノとピンホールの位置、レーザーパワーの調節か可能となっている。

ピンホールサイズは 50nm 固定、検出波長は 560nm。検出ユニットのサイズは 157×489×294、重量は 13kg となっている。本小型 FCS の性能は、カールノアイス社製 FCS とほぼ同等であった。

小型 FCS を用いて rPrP 有無の試料を測定した結果、試料間の拡散時間に有意な差が認められた。また、考案した検出原理を用いて、FCS を用いても rPrP のような低分子量の抗原を検出することか可能であることを示した。

詳細に検討した結果、標識抗体と抗原の会合体の理論的な拡散時間 (DT Diffusion time) は理論値よりも約 20% 低かった。一分子あたりの蛍光強度を示す値 (CPM Count per molecule) は、rPrP の有無に関わらず一致した。全体の蛍光強度 (CPS Count per second) と焦点領域内の時間当たりの分子数 (PN Particle number) は、どちらも rPrP なしの試料の値が高かった。

さらに、rPrP を滴定した結果、現在のところ検出限界値は数 10nM であった。

#### D 考察

全自動化システムの中で、検出部位となる小型 FCS はほぼ完成したと考える。今後は、システムへの分注器と流路型セルの組み込みを検討する。

理論的な DT からのズレは、蛍光色素の退色か原因かもしれない。rPrP なしの試料について、CPS と PN の値が高かった理由は、会合体のガラス面への吸着か原因かもしれない。

-80 度で凍結保存した標識化抗体は、融解後に多量に沈殿した。これは、不活性化した抗体の存在を示唆している。したがって、保存方法を検討する必要がある。結果、検出感度の向上が見込まれる。

2 色の蛍光標識抗体を用いた場合、検出感度の向上が見込めることをモデル実験で確認した。これをプリオン蛋白へも応用する。

今回考案した FCS を用いて低分子量の抗原を検出する原理は、原理的に別の抗原抗体反応への応用も可能である。

#### E 結論

小型 FCS を用いて rPrP を検出してきた。検出限界値は現在のところ数 10nM である。今後は、脳乳剤を含んだ試料を用いて検討する。さらに、全自動化システムの構築に向け、分注器と流路型セルを組み合わせる予定である。

#### F 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Nishimura G, Tamura M Simple Setup for Nanosecond Time-Resolved Spectroscopic Measurements by a Digital Storage Oscilloscope Phys Med Biol 48 283-290, 2003
- 2) Foldes-Papp Z, Kinjo M, Saito K, Kii H, Takagi T, Tamura M C677T Single Nucleotide Polymorphisms of the Human Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Specific Identification Mol Diagn 7 99-111, 2003
- 3) Maruo K, Tsurugi M, Chin J, Ota T, Arimoto H, Yamada Y, Tamura M, Ishii M, Ozaki Y Noninvasive Blood Glucose Assay Using a Newly Developed Near-Infrared System IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 9 322-330, 2003
- 4) Fujii F, Tamura M Light Scattering Changes in Isolated Brain Mitochondria during Anoxia - Magnesium Effect on Morphological Changes and Respiration- Optical Review 10 440-443, 2003
- 5) Fujii F, Nodasaka Y, Nishimura G, Tamura M Anoxia induces matrix shrinkage accompanied by an increase in light scattering in isolated brain mitochondria Brain Res 999 29-39, 2004
- 6) Maruo K, Tsurugi M, Tamura M, Ozaki Y In Vivo Noninvasive Measurement of Blood Glucose by Near-Infrared Diffuse-Reflectance Spectroscopy Applied Spectroscopy 57 1236-1244, 2003
- 7) Oya S, Inoue H, Nakade T, Ogata A, Tamura M, Kato S Near-infrared Spectroscopy

- Evaluated as a Technique for Estimating Udder Haemodynamics in the Lactating Cow  
J Vet Med A 50 230-234, 2003
- 8) Tarumi M, Shimada M, Murakami T, Tamura M, Shimada M, Arimoto H, Yamada Y  
Simulation Study of In Vitro Glucose Measurement by NIR Spectroscopy and a Method of Error Reduction Phys Med Biol 48 2373-2390, 2003
  - 9) Saito K, Ito E, Takakuwa Y, Tamura M, Kinjo M  
In Situ Observation of Mobility and Anchoring of PKC $\beta$ I in Plasma Membrane FEBS Lett 541 126-131, 2003
  - 10) Tokuriki N, Kinjo M, Negi S, Hoshino M, Goto Y, Urabe I, Yomo T  
Protein Folding by the Effects of Macromolecular Crowding Protein Science 13 125-133, 2003
  - 11) Nishimura G, Kinjo M  
Visible Emission of a Photoproduct from Tryptophan Solution Induced by Multiphoton Excitation An Investigation by Intensity Fluctuation Analysis J Phys Chem B 107 6012-6017, 2003
  - 12) 金城政孝 細胞内生体高分子相互作用の解析をめさす蛍光相関分光法 ハイオイメーションクの最前線、楠見明弘（編）、羊土社、2003年1月1日
  - 13) 斉藤健太、金城政孝 タンパク質相互作用のリアルタイム解析 蛍光相関顕微鏡プロテオミクスの最前線、磯辺俊明（編）、羊土社、2003年1月1日

## 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

分担研究者 堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科教授

研究協力者 佐々木健介、岩城 徹（九州大学大学院医学研究院）

研究要旨 プリオン病の診断・研究においてプリオン蛋白免疫染色法は不可欠であるか、免疫賦活法を改良して感度・特異性・迅速性において従来法よりも優れたプリオン蛋白免疫染色法を開発した。同法を用いた病態解析より、脾臓における補体系因子の発現変動が病態マーカーとなりえることを明らかにした。

### A 研究目的

プリオン病診断の感度・特異性・迅速性を向上させるための方策を開発することか本研究の目的である。今年度は、プリオン蛋白免疫染色における免疫賦活法について研究を行った。プリオン病の診断・研究において、プリオン蛋白免疫染色法は不可欠であるか、前処置として免疫賦活法が必要である。そこで、簡便で感度がよく組織形態が保たれる免疫賦活法を開発した。また、それを応用して、プリオン病において末梢感染の際に感染因子の増幅拠点となっている脾臓で疾患マーカーあるいは病態マーカーとなりえる因子として補体系蛋白に焦点を絞り免疫組織化学的検討を行った。補体系蛋白は遺伝性プリオン病罹患脳に見られるプリオン蛋白アミロイド斑に共存するなどプリオン蛋白との関連が示唆されており、補体系蛋白の発現を抑制、あるいは補体レセプターであるCR1をノックアウトしたマウスでは、プリオン病感染因子の腹腔内投与による伝播・発症が抑制されることか報告されている。

### B 研究方法

#### (1)プリオン蛋白免疫染色法の改良

通常使用される組織標本であるホルマリン固定パラフィン切片（CJD患者及びGSS患者の剖検材料（脳組織）とプリオン病疾患モデルマウスの研究材料（脳組織と脾臓））を用いて、免疫賦活処理として様々なハノファー溶液中でオートクレーブ（121℃、10分）処理を行った。免疫賦活処理後は3F4抗体（ヒト材料）あるいはPrP-C抗体（IBL社）（マウス材料）を

用いた間接法で免疫染色を行い、免疫賦活効果（感度）、特異性、簡便さ、形態保持に関して検討した。優れた結果を与えたハノファー溶液について、さらに組成物の濃度について細かく検討した。開発した方法と、汎用されている既存の方法との比較検討を行った。

#### (2)補体系蛋白発現に関する検討

NZWマウスに福岡1株を接種した感染マウスの脾臓のホルマリン固定パラフィン包埋切片を、プリオン蛋白に対する抗体PrP-C（IBL社）とCR1に対する抗体CD35（Dako社）あるいはclusterinに対する抗体（Santa Cruz社）を用いて2重免疫染色を行った。また、lymphotoxin β receptor-Igによりfollicular dendritic cellの分化を抑制したプリオン伝播抑制モデルマウスの脾臓組織（Mabbott NA, et al Nat Med 2001, 7 485-487）（Neuropathogenesis Unit, IAH, EdinburghのNeil A Mabbott博士より供与）において、異常プリオン蛋白沈着、CR1やclusterinの発現を同様に免疫組織化学で調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の承認を得て行った。

### C 研究結果

#### (1)プリオン蛋白免疫染色法の改良

汎用されている免疫賦活法として塩酸オートクレーブ法（1～2mM HCl溶液中でオートクレーブ（121℃、10分））と3段階法（蒸留水中でオートクレーブ（121℃ 10分）＋蟻酸処理5分＋クアニノン処理（4℃、2時間））か



ある。今回開発した方法は、賦活用の溶液を特別に調整する必要はなく、オートクレーフ（121°C、10分）処理は必要なものの、汎用されている既存の方法に比べてはるかに単純である。塩酸オートクレーフ法では、ノクナルを強く検出できるものの、組織の損傷が強く、形態を観察するには不向きであった。3段階法は感度は劣るものの、組織の保存は比較的良好であるか、操作手順が煩雑であるのか欠点であった。今回開発した方法は、バックグラウンドが低く抑えられるため、ノクナル/ノイス比が高く、脳組織での異常なプリオン蛋白の描出では塩酸オートクレーフ法よりも感度が若干低いものの、非特異的染色はまったく見られなかった。特に脾臓の follicular dendritic cell に蓄積したプリオン蛋白の検出感度・特異性は塩酸オートクレーフ法や3段階法よりもはるかに優れていた。また、組織がよく保たれるので形態を観察しやすく、2重免疫染色が可能であるなどの長所が見られた。

#### (2) 補体系蛋白発現に関する検討

今回開発した方法を用いて2重免疫染色にて解析した。NZWマウスに福岡1株を接種した感染マウスの脾臓では、異常なプリオン蛋白の沈着に一致して補体レセプターである CR-1 と補体抑制因子である clusterin の発現増加が認められた。プリオン蛋白の局在とこれらの補体系蛋白（特に CR-1）の局在は一致していた。このことは、lymphotoxin  $\beta$  receptor-Ig により follicular dendritic cell の分化を抑制したプリオン伝播抑制モデルマウスの脾臓組織においても、確認された。すなわち、脾臓組織へのプリオン蛋白の沈着と、これらの補体系蛋白の発現亢進が時間的・空間的に一致していた。

#### D 考察

これまでに開発されたプリオン蛋白免疫染色法では、いずれも組織形態にダメージを与えるものであり、微細な形態的観察が困難であった。また、異常なプリオン蛋白の描出には優れていたものの、非特異的反応が出現したり、他の因子の局在を同じ切片上で同時に2重免疫染色などで観察することは困難であった。これ

は、免疫賦活法として強力な蛋白質分解処理や蛋白質変性処理が必要であったためである。今回開発した方法は、これまでの方法に比べて蛋白質分解効果や蛋白質変性効果はきわめて弱いことか考えられる。詳細な機序については不明であるものの、抗体が認識する組織中のプリオン蛋白エピトープを露出させるために有効に働いていることは間違いない。

一方、プリオン病感染因子の末梢からの（経口あるいは血液を介した）伝播・発症には、脾臓、リンパ装置など網内系や補体系が関与していることか指摘されており、C3レセプターである CR1 は、ノクアウトマウスにおいてプリオン病感染因子の腹腔内投与による伝播の抑制が観察されている（Mabbott NA, et al Nat Med 2001, 7 485-487, Klein MA, et al Nat Med 2001, 7 488-492）。今回の解析では、脾臓での異常プリオン蛋白の沈着と CR1 や clusterin の発現量か時間的・空間的に一致することから、CR1 や clusterin が異常型プリオン蛋白の産生に何らかの役割を果たしているものと考えられる。また、同時に、今回の解析は、CR1 や clusterin の発現が病態マーカーとなりえることを明らかにした。

#### E 結論

プリオン蛋白免疫染色法を改良して感度・特異性・迅速性において従来法よりも優れたものを開発した。また、同法を用いた病態解析より、脾臓における補体系因子の発現変動が病態マーカーとなりえることを明らかにした。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models J Virol (in press)
- 2) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y,

- Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies *J Gen Virol* (in press)
- 3) Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies *J Virol* 78 1281-1288, 2004
- 4) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation *Neurology* 62 502-505, 2004
- 5) Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease diffusion-weighted MRI and PET characteristics *J Neuroimaging* 14 63-66, 2004
- 6) Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo *Lab Invest* 83 1751-1759, 2003
- 7) Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease *Acta Neuropathol* 106 92-96, 2003
- 8) Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions *Intern Med* 42 199-202, 2003
- 9) 堂浦克美 プリオン病治療薬の開発 神経研究の進歩、47 109-118, 2003
- 10) 堂浦克美 プリオン病研究の進歩 脳科学研究の現状と課題 杉田秀夫、高橋清久編集、311-315 頁、平成 15 年 9 月、しほう社、東京
- 2 学会発表
- 1) 堂浦克美 「プリオン病の治療戦略」 第 26 回日本医学会総会学術講演会、痴呆の克服、シンポジウム、福岡、2003 年 4 月
- 2) 堂浦克美 「プリオン病の治療」 第 44 回日本神経学会総会、シンポジウム、横浜、2003 年 5 月
- 3) 堂浦克美 「ヒトプリオン病の現況」 第 51 回日本輸血学会総会、シンポジウム、北九州、2003 年 5 月
- 4) 堂浦克美 「BSE とヒトプリオン病」 第 24 回衛生微生物技術協議会総会、シンポジウム、福岡、2003 年 7 月
- 5) Doh-ura K “Experimental animal studies on pentosan polysulphate” Case conference on Jonathan Simms An inter-disciplinary meeting Belfast, UK, September 2003
- 6) Kawatake S, Doh-ura K, Murakami-Kubo I, et al “Interaction of anti-prion chemicals with prion protein analyzed by surface plasmon resonance” International prion conference Munchen, Germany, October 2003
- 7) Doh-ura K “Interaction of prion protein and anti-prion chemicals” 第 76 回日本生化学会大会、シンポジウム、横浜、2003 年 10 月
- 8) 堂浦克美 「抗プリオン作用を持つ化合物の性質」生体分子ダイナミクスと機能立体構造形成研究会、岡崎、2003 年 12 月
- H 知的所有権の出願・登録状況  
 工藤幸司、澤田徹、堂浦克美 プリオン蛋白質蓄積性疾患の診断プローブおよび治療薬ならびにプリオン蛋白質の染色剤 PCT/JP03/11056 2003 年 8 月

# 10. プリオン蛋白の細胞内動態と食品試験への応用

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 牛海綿状脳症 (BSE) のイムノアッセイに用いる標準品の確保を目的とし、ヒトクリオフラストーマ細胞株 T98G が産生する蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP<sup>res</sup>) の性質を調べた。

長期間の培養により PrP<sup>res</sup> を産生する T98G 細胞から全細胞抽出液を調製し、牛海綿状脳症 (BSE) のウエスタンブロット法による確定診断に用いられているウサキポリクローナル抗体 B103 及びヒトクロイツフェルトヤコブ病の検出に用いられているマウスモノクローナル抗体 3F4 に対する反応性を調べた。ヒトプリオン蛋白質のアミノ酸 144-152 残基を認識するマウスモノクローナル抗体 6H4 は、PK で消化 (10 µg/ml、30 分間、37°C) した全細胞抽出液中の PrP<sup>res</sup> を認識した。しかし、ウシプリオン蛋白質の 103-121 残基を認識する B103 抗体及びヒトプリオン蛋白質の 109-112 残基を認識する 3F4 抗体は、PK で消化した全細胞抽出液中のプリオン蛋白質を認識しなかった。

BSE のスクリーニング検査に用いられるプラテリア BSE の酵素処理工程を含めたハリテーションを目的とし、T98G 細胞の全細胞抽出液及び組換えウシプリオン蛋白質をプラテリア BSE 検出キットで測定を行った。プラテリア検出キットに用いられている抗体は組換えウシプリオン蛋白質及び T98G 細胞が産生する非酵素処理ヒトプリオン蛋白質を認識して cut-off 値より高い測定値を示したか、PK 消化した試料の測定値は cut-off 値より低く陰性と判定した。

以上の結果から、現状では T98G 細胞の全細胞抽出液は BSE スクリーニング検査および確定診断の標準品として適用不可であった。

## 協力研究者

山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

法に適用し、プリオン蛋白質 (PrP) に対する抗体の反応性を検討

2 BSE のスクリーニング検査用動物医薬品プラテリア BSE を用い、T98G 細胞の全細胞抽出液の調製および PrP<sup>res</sup> 測定の検討

## A 研究目的

食品、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>) の簡便 迅速な検出法の開発が望まれている。

本研究では Proteinase K (PK) 処理を含めた試料前処理法に適用可能なイムノアッセイの標準品の確保を目的とし、長期間の培養により蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP<sup>res</sup>) を産生する T98G 細胞の全細胞抽出液を用いて次の項目について検討した。

1 T98G 細胞の全細胞抽出液を牛海綿状脳症 (BSE) の確定診断のウエスタンブロット

## B 研究方法

### 1 ウエスタンブロット法

ヒトクリオフラストーマ細胞株 T98G を培養後、全細胞溶解液を調製し、PK 消化 (10 µg/ml、30 分間、37°C) 後、SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜へ転写した。抗 PrP 抗体を用いたイムノブロットニングを行い、化学発光法で PrP を検出した。抗体にはヒト PrP のアミノ酸 144-152 残基を認識するマウスモノクローナル抗体 6H4、109-112 残基を認識するマウスモノクローナル抗体 3F4 及びウシ PrP のアミノ酸 103-121 残基

を認識するウサキポリクローナル抗体 B103 を用いた。

## 2 プラテリア BSE

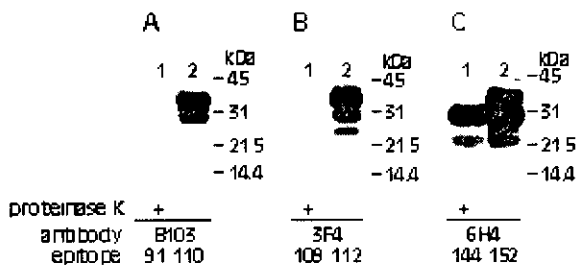
プラテリア BSE キット（日本ハイオ ラトトラホラトリス）を用い、マルチヒースシヨノカーMB501(S)型（安井器機）で T98G 細胞の全細胞抽出液を調製し、PK 消化後に試料中に残存する PrP<sup>res</sup> を測定した。

## C 研究結果

### 1 ウェスタンブロット法による T98G 細胞中の PrP<sup>res</sup> の測定

確定診断の標準品として用いる PrP<sup>res</sup> の調製を目的とし、T98G 細胞の全細胞抽出液中の PrP<sup>res</sup> をウェスタンブロット法で測定した。

細胞を 40 回の継代後に播種して 40 日後に全細胞抽出液を調製し、PK で消化後にウェスタンブロット法を行った。PK 未処理の全細胞抽出液では、6H4 抗体が認識する 35 kDa、31 kDa 及び 25 kDa に PrP に相当するバンドを示したか（Fig 1C, lane 2）、PK 処理で 35 kDa のバンドが消失し、PK 処理耐性の 31 kDa のバンドを示した（Fig 1C, lane 1）。しかし、B103 抗体（Fig 1A）及び 3F4 抗体（Fig 1B）は、PK 未処理では 6H4 抗体と同様な反応性を示したか、PK 処理後の試料では PrP<sup>res</sup> に相当するバンドを示さなかった。



**Fig 1** Immunoblot analysis using anti-PrP antibodies for the protease-resistant form of PrP in T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 40 days after 40 passages (P40D40), and whole cell lysates were prepared. Lysates (50 µg protein) were treated with PK (10 µg/ml) at 37°C for 30 min (lane 1) or left undigested (lane 2). The PK-treated lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with the B103 (A), 3F4 (B) or 6H4 (C) antibodies. Epitope recognition sites located within PrP are shown as amino acid numbers.

### 2 プラテリア BSE キットによる T98G 細胞中の PrP<sup>res</sup> の測定

プラテリア BSE キットの PK 処理行程を含めた感染性のない陽性コントロールの確保を目的とし、標準品として T98G 細胞の全細胞抽出液の適用を試みた。

長期間培養後の T98G 細胞（9 cm ティンニュー 4 枚）からプラテリア BSE キットを用いて調製した全細胞抽出液（総蛋白質量 43 mg）及び組換えウノプリオン蛋白質（10 µg）を試料とし、PK 処理後に PrP<sup>res</sup> の測定を行った。キットに用いられている抗体は PK 未処理の組換えウノ PrP 及び全細胞抽出液中の PrP を認識し、キットに添付されている陽性コントロールと同等の値を示した（Table 1）。しかし、PK 処理した組換えウノ PrP 及び全細胞抽出液中の PrP は認識されず、それらの測定値は cut-off 値より低い値を示した（Table 1）。

Table 1 プラテリア BSE キットによる PrP の測定

試料	PK 処理	測定値
cut-off 値	-	0.217
陽性コントロール	-	1.493
組換えウノ PrP 10 µg	+	0.005
	-	1.932
T98G 細胞、全細胞抽出液	+	0.010
2.9×10 <sup>7</sup> cells 湿重量 330 mg	-	1.478

## D 考察

食品、医薬品及び医療用具等の PrP<sup>Sc</sup> の汚染を防ぐために、高感度な PrP の検出法を確立する必要がある。現在、国内の屠畜場では全ての牛を対象とし、延髄の問を検体としてプラテリア BSE キットを用いたスクリーニング検査を行っている。陽性になった検体は、ウェスタンブロット法、免疫組織化学検査及び病理組織検査の結果をもとに確定診断を行っている。これらの検査に当たり、プラテリア BSE キット及びウェスタンブロット法では測定試料を PK 処理し、残存した PrP<sup>res</sup> を測定している。しかし