

現状では試料のPK処理行程を判定する有益な標準品かない。

先に、ヒトグリオーマ細胞株 T98G は PrP を産生し (1)、長期間培養すると PK 処理抵抗性の PrP^{res} を産生することを報告した。そこで、本年度は PK 処理から測定までの行程を通しての標準品として、T98G 細胞が産生する PrP^{res} の適用を検討した。

ウエスタンブロット法による解析では、プリオニクステスト (プリオニクス社) に用いられている 6H4 抗体は T98G 細胞が産生する PrP^{res} を認識したか、確定診断に用いられている B103 抗体は認識しなかった。先に、T98G が産生する PrP^{res} は PK 処理で N 末端側が切断されヒト PrP の 109-112 残基をエピトープとして認識する 3F4 抗体は反応性を示さないことを報告した。B103 抗体がエピトープとして認識するウシ PrP 103-121 残基はヒト PrP の 91-110 残基に相当することから、本抗体も PK 処理した T98G 細胞の全細胞抽出液に反応性を示さなかったと推定される。

プラテリア BSE キットによる PrP^{res} の測定では、PK 未処理の T98G 細胞の全細胞抽出液及び組換えウシ PrP はキットに用いられている抗体が認識し、陽性コントロールと同様の値を示した。しかし、PK 処理した試料は認識されず、その測定値は cut-off 値より低く、判定は陰性であった。先に 6H4 抗体を用いた競合的 ELISA で、T98G 細胞の PK 処理した全細胞抽出液中の PrP^{res} を測定可能なことを報告した。これらの結果から、ウエスタンブロット法で PrP^{res} を認識しなかった B103 抗体と同様に、プラテリア BSE キットに用いられている抗体が認識するエピトープは PK 処理で消化され反応しなかったと推定される。

E 結 論

平成 15 年度はイムノアッセイに用いる標準品の確保を目的とし ヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G が産生する PrP^{res} のウエスタンブロット法及びプラテリア BSE キットへの適用を試みた。

キットで用いられている抗 PrP 抗体は、PK

処理した T98G 細胞の全細胞抽出液中の PrP^{res} を認識しなかったことから 現状では BSE スクリーニング検査および確定診断の標準品としては適用不可であった。

平成 16 年度は、PrP^{res} の産生様式や細胞内動態の研究を進める予定である。

F 参考文献

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)

G 健康危険情報

なし

H 研究発表

1 学会発表

- 1) Kikuchi Y, Kakeya T, Sakai A, Takatori K, Nakamura N, Matsuda H, Yamazaki T, Tanamoto K, Sawada J In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP^{res} in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G Keystone Symposia Molecular Aspects of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases), April, 2003, Breckenridge, Colorado, USA
- 2) 菊池 裕, 掛谷知志, 高鳥浩介, 中村尚彦, 松田治男, 山崎 壮, 棚元憲一, 澤田純一 In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP^{res} in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. 第 76 回日本生化学会大会, 2003 年 10 月, 横浜

1 1. 高感度バイオアッセイ系の開発

分担研究者 松田 潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部室長

研究要旨 安定したウシ異常型プリオン蛋白の作製と供給、ハイオアノセイ系確立などを目的として、ウシプリオン単独発現マウスの作成を行った。今年度は、ウシプリオン遺伝子導入マウスファウンター 4 匹を作出し、各臓器でウシプリオン蛋白が過剰発現していることを確認した。プリオン KO マウスにトランスジーンを導入したマウス Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}および Tg#39(BoPrP+/+)/Prnp^{-/-}へ BSE 乳剤の脳内および腹腔内接種を開始した。現在までに、脳内接種後 104 日の Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}の脾臓においてウシ異常型プリオンと考えられる蛋白が検出されており、高感度ハイオアノセイ系として期待される。

A 研究目的

本年 2 月にはウシ海綿状脳症 (BSE) の日本での 10 頭目が確認され、さらに昨年末にはアメリカでも BSE が見つかかり、米国産牛肉の日本への輸入停止措置が執られるなど、BSE は引き続き食の安全性に対する大きな社会的問題を引き起こしている。一方、BSE 病原体である異常プリオンタンパク質が正常型からどのようにして形成されるのか、またウシ海綿状脳症の感染・発症機構については不明の点が多く、科学的な解明が必要であり、これらの研究のためには、とくに実験動物を用いた感染実験系およびハイオアノセイ系が必須である。本研究では、プリオンノックアウトマウスを使用してトランスジェニック (Tg) によりウシプリオン単独発現マウスを作成し、BSE 乳剤を接種し、安定した (株化) ウシ異常型プリオン蛋白の作製と供給、BSE の発症機構、病理解析、薬剤スクリーニング、さらに感染価測定、診断系のためのハイオアノセイ系確立を目的とする。

B 研究方法

1) ウシプリオン発現トランスジェニックマウス作成と解析

ホルスタイン種ウシゲノム DNA から PCR クローニングにより得たウシプリオン遺伝子 (ORF、264 アミノ酸をコード) と強発現用プロモーター CAG プロモーター (ニワトリア

クチンプロモーター) との融合遺伝子 DNA 断片 (3.2 kbp) を、トランスジーンとした。トランスジーン DNA を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションして Tg ファウンターマウスを 4 系統作成した。ゲノミクス解析によりコピー数の推定をし、さらに 2 段階ゲノムウォーキングにより導入遺伝子部位の近傍遺伝子配列を決定し、近傍プライマー法による Tg ホモ、ヘミの PCR による判定法を開発した。Tg マウスのウシプリオン mRNA の発現解析は、脳より RNA を抽出し特異的なプライマーセット 4 種類を用い RT-PCR により行い、さらに常法によりウシプリオン遺伝子 600bp をプローブとしてノーザン解析を行った。4 系統の Tg マウスの各臓器のウシプリオン発現は、1 次抗体として抗ウシプリオン抗体 (B103, 44B1) を用いウェスタンブロット法により検索した (感染研山河博士との共同研究)。各 Tg マウスは、プリオンノックアウトマウス Prnp^{-/-} (C57BL/6 congenic 系、理研糸原博士より供与された) と交配することにより、ウシプリオン単独発現 Tg マウスを作成した。

2) ウシプリオン単独発現 Tg マウスへの BSE 乳剤の接種実験

ウシプリオン単独発現 Tg マウス #39 においてトランスジーンに関してヘミ (Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}) およびホモ (Tg#39(BoPrP+/+)/Prnp^{-/-}) の個体を作成し、

これらのマウスに和歌山例 BSE ウシの脳乳剤を脳内（10%脳乳剤 25 μ l）及び腹腔内（2.5%脳乳剤 100 μ l）に接種した。現在、臨床症状、発症状況を観察するとともに、一部の動物については剖検し、ウシ異常プリオン蛋白をウェスタンブロット法にて検査した。

（感染研山河博士との共同研究）

（倫理面への配慮）

実験動物については、実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行う。異常型プリオンの取り扱い及びマウスへの感染は国立感染症研究所におけるハイオセーフティー安全規定を遵守し、国際的な基準にも十分に配慮する。

C 研究結果

1) ウシプリオン発現トランスジェニックマウス作成と解析

ウシプリオン Tg マウス 4 系統（#39, 91, 94, 96）が得られた。ゲノムノックササン解析によって #39, 91, 94 ではトランスジェンが 1 コピー～数コピー導入されており、#96 では多数コピーが導入されていることが判った。また 3 系統（#39, 91, 94）において transgene の染色体上の挿入部位を特定し、Tg ホモヘミ（zygosity）判定用 PCR 系を確立した。Tg 4 系統（Tg(BoPrP)/Prnp+/+, #39, 91, 94, 96）において、ウシプリオン遺伝子発現（RT-PCR、ノサン解析）および、各臓器（脳、脾臓、心臓）でのウシプリオン蛋白質発現（ウェスタン解析）を確認した。Tg マウスを KO マウス（Prnp^{-/-}）と交配することにより現在までに 2 系統の Tg(BoPrP)/Prnp^{-/-}を得た（#39, #91）。Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}においてウシプリオン蛋白の各組織の発現パターンを検索し、脳を含む多くの臓器で高発現していることを確認した。

2) ウシプリオン単独発現 Tg マウスへの BSE 乳剤の接種実験

BSE 乳剤を Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}および Tg#39(BoPrP+/+)/Prnp^{-/-}の脳内および腹腔内に接種し、現在、経過を観察中であるか、投与

後約 5 か月現在では、とくに臨床症状は認められない。一方、接種後 104 日において殺処分して、途中経過を検査したところ、脳内接種した Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}の脾臓において、ウェスタンブロットによりプロテナーゼ K 抵抗性でウシ異常型プリオンと同様のパターンを示す蛋白が検出された（図 1）。

D 考察

ウシプリオン発現 Tg マウスを 4 系統作出し、ケノムウオーキックにより染色体上の遺伝子挿入部位を決定し、Tg ホモ、ヘミの PCR による判定法を開発することか出来た。ウシプリオンかより多発現している方か高感度のハイオアノセイ系となると考えられていることから、複数ラインの Tg マウスの組合せによる transgene dosage の増大か有効と考えられるか、その場合にこの PCR による判定法を用いれば、複数のトランスジェンを判別できるので有用であると考えられた。Tg 4 系統（Tg(BoPrP)/Prnp+/+, #39, 91, 94, 96）において、各臓器（脳、脾臓、心臓）でウシプリオン蛋白質発現か確認でき、KO マウス（Prnp^{-/-}）の遺伝的背景に、先行してトランスジェンを導入することか出来た Tg#39 において、BSE 乳剤の接種試験を開始した。現在臨床症状などの発症を観察中であるか、脳内接種後 104 日において Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp^{-/-}の脾臓において、ウシ異常型プリオンと見なされる蛋白の蓄積を確認することか出来た。今後の臨床経過の観察や詳細な病理学的検索か必要であるか、現在までの結果から、このマウス系統は BSE プリオンの増殖系として、また高感度ハイオアノセイ系として有用であることか期待される。

E 結論

安定したウシ異常型プリオン蛋白の作製と供給、ハイオアノセイ系確立などを目的として、ウシプリオン単独発現マウスの作成を行った。今年度は、ウシプリオン遺伝子導入マウスファウンダー 4 匹を作出し、各臓器でウシプリオン蛋白か過剰発現していることを確

認した。プリオン KO マウスにトランスノー
 ンを導入したマウス Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp-/-お
 よひ Tg#39(BoPrP+/+)/Prnp-/-へ BSE 乳剤の脳
 内および腹腔内接種を開始した。現在までに、
 脳内接種後 104 日の Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp-/-の
 脾臓においてウノ異常型プリオンと考えられ
 る蛋白が検出されており、高感度ハイオアノ
 セイ系として期待される。

F 健康危険情報

該当なし

G 研究発表

1 論文発表

Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, Koura
 M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y,
Matsuda I, Suzuki O Chromosomal mapping
 and zygoty check of transgenes based on
 flanking genome sequences determined by
 genomic walking Exp Anim, in press, 2004

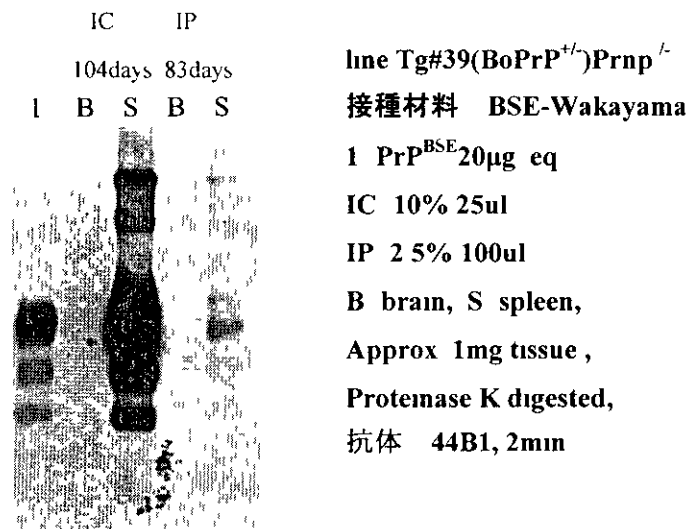


図1 ウシプリオン単独発現 Tg マウスへの BSE 乳剤接種実験

1 2. 動物プリオンタンパクの遺伝子解析

研究分担者 石黒 直隆 帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室教授

研究要旨 ウンとヒノンの PrP 遺伝子のアミノ酸多型について調査した。また、ウンにおいては Exon1 近傍の転写調節領域の DNA の塩基置換の有無についても検討した。667 頭のウンを調査した結果、6 回のオクターリピートを有するウンが 595 頭と多かったか、6 回と 5 回のヘテロのウンや 5 回のリピートをホモで有するウンは少なかった。PrP 遺伝子のコート領域では 234 番と 576 番に塩基置換が見られたか、アミノ酸置換を起こす塩基置換は検出されなかった。日本でみつかった BSE 感染牛 6 頭の PrP 遺伝子を調査したか、アミノ酸置換を有するウシは検出されなかった。転写調節領域では、12 塩基を欠失しているウシが調査した 126 頭中 49 頭と検出されたか、ホモで 12 塩基を有しているウンは 20 頭と少なく、ヘテロで有しているウンは 57 頭と多かった。6 頭の BSE 感染牛のうち、神奈川と北見のウシがヘテロであった他は全てホモで 12 塩基を欠失していた。ヒツシの PrP 遺伝子に関しても 315 頭調査したか、スクレイピーに感受性を示す 136 番ハリンを有するヒツシは少なかった。

A 研究目的

ヒツシやヤキ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、病気の発症が大きく影響される。一方、ウシに関しては PrP 遺伝子の蛋白コート領域内で塩基置換が少ないこともあり、アミノ酸の置換と牛海綿状脳症 (BSE) 発症の間には明確な関係の存在は報告されていない。これまでにウンの PrP 遺伝子のアミノ酸コート領域の多型として、オクターリピート配列、G7A, E226K などの多型が報告されている。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。本年度は、日本で飼育されているホルスタイン牛の PrP 遺伝子多型を調査し、多型の有無を明らかにすることを目的とした。また、BSE 罹患牛の PrP 遺伝子多型についても検討した。

一方、ウンの PrP 遺伝子内にはアミノ酸をコートする領域以外にも DNA 多型が存在すること知られている。特に Exon1 近傍の PrP 遺伝子発現調節領域には多くの塩基置換が存在する。また、ウンをはじめ多くの動物の PrP 遺伝子で、PrP 遺伝子の発現が Exon1 下流の Intron1 内の特定領域により影響を受けることが明らか

かとなっている。この Intron1 内には 12 塩基の欠失があり、その欠失領域には転写に関与する SP1 サイトが存在し、この 12 塩基の欠失の有無により PrP 遺伝子の発現が影響を受ける可能性が高い。そこで、本研究では、Intron1 内の塩基置換に関しても調査を行った。

ヒツシにおいては、これまでのところ多くの研究がなされてきており、136 番アラニンがハリンに置換すると、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キニンに置換するとスクレイピーに対する感受性が低下する。本研究では、昨年度に引き続きヒツシとヤキのスクレイピーサーヘイランズで送られてきた検体を用いヒツシの PrP 遺伝子のアミノ酸多型についても検討した。

B 研究方法

研究対象検体 ウシの PrP 遺伝子の多型解析に用いたサンプルは、8 牧場のホルスタイン牛 303 頭から採取した血液と、帯広市内のと畜場にて採取したホルスタイン牛 358 頭の血液である。BSE 感染牛のサンプルは、天塩、神奈川、埼玉、和歌山、釧路、北見の BSE 罹患牛由来のサンプルである。ヒツシの検体に関しては、

2001年11月より開始されているヒツンとヤキのスクレイパーヘイランスで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ヒツン315検体(7自治体 栃木県、青森県、宮城県、佐賀県、石川県、北海道、東京)を用いた。

検査方法 ウンは血液、ヒソンは扁桃組織から総DNAを分離してPCR用の試料とした。ウシPrP遺伝子コート領域は、PCRにて増幅後、ダイレクトノックエンスにてDNAの塩基配列を決定して塩基置換やアミノ酸の多型解析を行った。コート領域内のオクターリピートについては、リピート回数を電気泳動にて判断できるようにプライマーを設計し、400bpのハントとして検出した。ウシPrP遺伝子の転写調節領域の多型解析は、12塩基配列の欠失領域をPCR法にて増幅後、ダイレクトノックエンスと制限酵素SacIIの消化により12塩基配列の欠失の有無を判定した。ヒソンの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/ハリン)、154番(アルキニン/ヒスチニン)、171番(クルタミン/アルキニン/ヒスチニン)の4箇所のアミノ酸置換を1塩基置換解析(SNPs)で調査した。

(倫理面への配慮)

本研究で検索した羊の検体は全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、と畜場にて採取した血液と、畜主の同意をえて採取した血液検体である。

C 研究結果

ウシのPrP遺伝子ORF内の多型解析 ウシPrP遺伝子のORF内の多型と今回調査したホルスタイン667頭の塩基置換の結果を図1に示した。オクターリピートは調査した667頭中6回をホモに有する頭数が595頭と最も多く、6回と5回をヘテロに有する頭数が69頭、5回をホモに有する頭数が3頭と最も少なかった。7回のオクターリピートを有するウシは本研究では検出されなかった。230頭のウシのORF内のDNA塩基置換を調査した処、塩基番号234番(G/A)と576番(C/T)で塩基置換が見

られたか、アミノ酸の置換はみられなかった。6頭のBSE感染牛のPrP遺伝子を検査した処、6頭とも全て6回のオクターリピートを有していた。神奈川と北見のサンプルで234番目のDNA塩基置換が見られたか、576番の置換は見られなかった。しかし、アミノ酸の置換をもたらす塩基置換はBSE罹患牛からは検出されなかった。

ウシPrP遺伝子の転写調節領域内の多型解析 PrP遺伝子Exon1内に検出される12塩基配列の欠失について調査した成績を図2に示した。この12塩基配列の領域には制限酵素SacIIサイトが存在することから、PCR法にて12塩基配列付近を増幅後、SacIIによる切断とダイレクトノックエンスにて12塩基配列の有無を確認した。調査した126頭のウシのうち、欠失のホモが49頭、ヘテロに保有するものが57頭、ホモに保有するウシが20頭と12塩基を欠失するウシが多かった。6頭のBSE罹患牛の成績も図2にしめしたか、神奈川および北見のサンプルを除いて、残り4サンプルは12塩基をホモで欠失していた。

ヒツンのPrP遺伝子のアミノ酸多型 今回検索したヒツン315頭のPrP遺伝子の4箇所のアミノ酸置換を表1に示した。ヒツンPrP遺伝子の野生型であるMARQ型は検査した315検体中109検体と最も多く優位な遺伝子型であった。スクレイパーに高感受性の136番ハリンをヘテロに有するヒソンは5頭と少なく、ホモに136番ハリンを有する個体は検出されなかった。一方、スクレイパーに抵抗性を示すアミノ酸置換171番アルキニンを有するヒソンは、ホモで27頭、ヘテロで131頭と意外と多かった。今回の検索では154番ヒスチニンの置換を有するヒソンの6頭検出された。

D 考察

今回の研究で、日本で飼育されているホルスタイン牛の多くは6回のオクターリピートをホモで有している牛が圧倒的に多く、5回と6回のヘテロや5回のホモのリピートを有する牛は少ないことが明らかとなった。また、PrP遺伝子ORF内のDNA塩基置換も極めて少なく、

以前に報告されている234番と576番以外の塩基置換は検出されなかった。BSE罹患牛6頭についてもPrP遺伝子の多型解析を行ったか、オクターリピートも6回のホモであり、ORF内の塩基置換も少ない牛群であった。昨年度、10年前に採取したウシのサンプルのPrP遺伝子多型を検索中、ORF領域の96アミノ酸が欠失したウシを偶然見つけた。本年度は、こうした広領域の欠失変異を有するウシが現在でも生存しているかどうかを知る目的で、ORF内の欠失変異を検索してきたか、今回調査した牛群内にはみつけれなかった。

ウシPrP遺伝子の転写調節領域であるIntoron1内の多型解析を行った結果、SP1サイトを含む12塩基配列が高率に欠失していることを見出した。むしろ、12塩基配列をホモで保有している個体数は少なかった。これまでの研究の多くが、12塩基配列を含んだDNA試料でPrP遺伝子の発現を研究してきたことから、今後は12塩基の欠失した試料でPrP遺伝子の発現をCatアンゼーなどを用いて検討する必要であろう。

ヒツンにおいては抵抗性の171番アルキニンを有するヒツンが予想以上に多く日本で飼育されていることか昨年度の調査に引き続き明らかとなった。また、今回検索した検体は7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ヒツンの遺伝子型を知るまでには至っていない。今回初めて154番ヒスチンを有するヒツンの存在を2自治体の試料で確認した。

E 結論

日本で飼育されているホルスタイン牛667頭のPrP遺伝子の多型解析を行った結果、オクターリピート領域、234番、576番にDNAの塩基置換を検出した。6頭のBSE罹患牛は全て6回のオクターリピートであり、DNAの塩基置換も少なかった。PrP遺伝子の転写調節領域に12塩基の欠失を見出した。ヒツンのPrP遺伝子のアミノ酸多型解析を行った結果、野生型と共に抵抗性の遺伝子型が多かった。

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

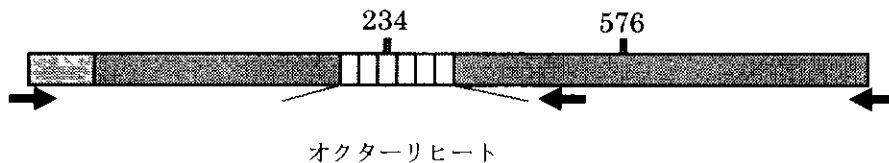
1 論文発表

Gombojav A, Shimauchi I, Hornuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, Kitamoto T, Miyoshi I, Mohri 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

2 学会発表

- 1) 堀内基広、梅谷 淳、工藤聡子、石里直隆、横山 隆、品川森一 BSE スクリーニング用 ELISA (OFR ELISA) の開発とその性能評価 第135回日本獣医学会(東京)2003年4月
- 2) 全チャンラン、堀内基広、石里直隆、品川森一 抗PrPモノクローナル抗体パネルによるPrPの構造解析 第135回日本獣医学会(東京)2003年4月
- 3) 大林浩二、堀内基広、石里直隆、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検索 第135回日本獣医学会(東京)2003年4月
- 4) 里崎茂久、片岡那津見、菊池宏明、田村勇耕、石里直隆、堀内基広、品川森一 ヒツンおよびヤキの伝達性海綿状脳症サーヘイランスとPrP遺伝子のアミノ酸多型 第135回日本獣医学会(東京)2003年4月
- 5) 三隅智子、石里直隆、堀内基広、品川森一 プリオンの環境汚染評価—植物への影響 第135回日本獣医学会(東京)2003年4月
- 6) 田村勇耕、堀内基広、石里直隆、古岡秀文、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と解析 第135回日本獣医学会(東京)2003年4月
- 7) 全チャンラン、品川森一、石里直隆、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(京都)2003年10月
- 8) 菊池宏明、品川森一、石里直隆、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(京都)2003年10月

オクターリピートの電気泳動像



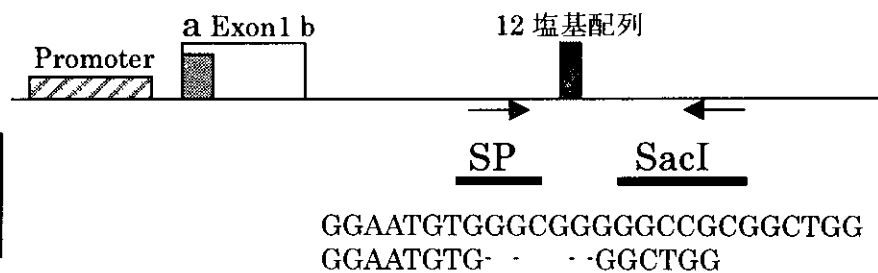
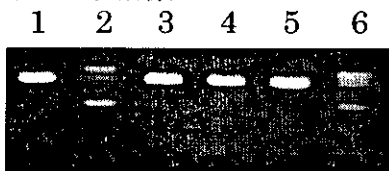
PrP ORF 内の DNA 塩基置換と多型

牧場	リピート			234			576			頭数
	6/6	6/5	5/5	g/g	g/a	a/a	c/c	c/t	t/t	
A	67	6	0	59	10	4	71	2	0	73
B	44	4	0	29	10	9	48	0	0	48
C	10	3	0	8	2	3	13	0	0	13
D	13	2	0	6	7	2	15	0	0	15
E	2	0	0	1	0	1	2	0	0	2
F	23	4	0	17	7	3	27	0	0	27
G	46	4	2	44	7	1	52	0	0	52
H	60	13	0		NT			NT		73
と畜場	324	33	1		NT			NT		358
BSE ウン(6頭)	6	0	0	4	1	1	6	0	0	6
合計	595	69	3	168	44	24	234	2	0	667

BSE 罹患牛 手塩、埼玉、神奈川、釧路、北見、和歌山 (アミノ酸置換なし)

図1 ウン PrP 遺伝子 ORF 内の DNA 多型 (オクターリピートの繰り返し数は PCR 後電気泳動で解析し PrP 遺伝子の ORF 内の DNA 塩基置換はシーケンスで解析)

BSE 感染牛サンプル (SacII 切断像)



12 塩基の保有と欠失頭数 (126 頭)

	牧場	ホモて保有	ヘテロて保有	ホモて欠失	
1	天塩 (ホモて欠失)	A	4	14	26
2	神奈川 (ヘテロて保有)	B	9	22	12
3	埼玉 (ホモて欠失)	C	4	4	5
4	和歌山 (ホモて欠失)	D	2	8	0
5	釧路 (ホモて欠失)	F	1	9	6
6	北見 (ヘテロて保有)	合計	20	57	49

図2 ウン PrP 遺伝子の発現調節領域の DNA 多型 (12 塩基配列の保有と欠失は制限酵素 SacII 切断とシーケンスで解析)

表1 調査したヒソンの PrP 遺伝子の遺伝子型

PrP 遺伝子の遺伝子型				由来	頭数	
112	136	154	171	112 136 154 171		
M	A	R	Q	/ M A R Q	栃木、青森、佐賀、宮城、東京、北海道	109
M	A	R	Q	/ T A R Q	栃木、宮城、石川、青森、北海道	35
M	A	R	R	/ M A R Q	栃木、宮城、青森、東京、北海道	96
M	A	R	Q	/ M A H Q	宮城	2
M	A	R	R	/ T A R Q	栃木、宮城、青森、北海道	29
M	V	R	Q	/ T A R Q	栃木、宮城	2
M	V	R	Q	/ M A R R	栃木	3
M	A	R	R	/ M A R R	栃木、宮城、青森	27
T	A	R	Q	/ T A R Q	栃木、青森	8
M	A	R	R	/ M A H Q	宮城、東京	3
T	A	R	Q	/ M A H Q	栃木	1
合計				7 自治体	315	

ヒソンサンプルは伝達性海綿状脳症サーベイランスの 315 サンプル

1 3. 動物プリオン病の病理学的診断に関する研究 —免疫組織化学的抗原賦活化法の改良及びパネル抗体による検討—

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学病態獣医学講座助教授

研究要旨 BSE 確認検査をはじめとする動物プリオン病のための免疫組織化学的方法はほぼ確立された手法であるか、抗原賦活化法に関しては改良の余地かあると考えられた。今回、121°C オートクレーフ法を基本とする従来の抗原賦活化法から、135°C オートクレーフ法に変更したところ、感度の点で優れていることか分かった。そこで、市販抗体を含む 17 抗体について 121°C オートクレーフ法と 135°C オートクレーフ法について比較検討を行った。135°C オートクレーフ法は連続エピトープを認識する抗体に対しては、121°C 法に比較して非常に優れた抗原賦活化法であると考えられた。しかしながら、非連続エピトープを認識する抗体では有効な結果を得られなかった。また、抗原賦活化法で使用した 17 種類の抗体を用いて、抗体の種特異性について、抗体エピトープと動物種間のアミノ酸配列との関連から検討した。動物種のアミノ酸配列と抗体エピトープの不一致か抗体の種特異性を規定する場合と規定しない場合かあった。このことから、免疫組織化学的抗原抗体反応は抗体のエピトープ領域全てが関与するのではなく、限定されたコア領域に依存する可能性かあることか推察された。

A 研究目的

動物プリオン病における免疫組織化学的検索のための抗原賦活化法の改良について検討を行った。BSE の確認検査をはじめとする免疫組織化学的方法では通常 121°C オートクレーフ法により抗原の賦活化を行うのか実際である。しかしながら、感染性の不活化のために実施する固定後の蟻酸処理は抗原性を著しく損なわせ、蟻酸処理を実施しない標本に比較すると免疫反応性が格段に下がることか知られている。そのため、121°C オートクレーフ法に加え、蟻酸、PK あるいはクアニノン等による処理や 121°C オートクレーフ法を 1mM 塩酸に標本を浸漬した状態で実施する等の抗原性回復のための工夫かなされている。今回 121°C オートクレーフ法に変えて 135°C オートクレーフ法を実施したところ、他の処理を追加することなく、抗原賦活化の点で優れた結果か得られた。BSE 確認検査やプリオン病研究のために他の方法との比較を行ったので概要を報告する。

次に 市販抗体を含む 17 種類のパネル抗体

を用いて、免疫組織化学的方法における種特異的なアミノ酸配列と抗体が認識するエピトープの関連について検討した。これは病理学的検査あるいは研究に際して有用なプローフである抗体の種特異性を規定する要因に関する情報か乏しいため、基本情報として明らかにする必要かあると考えられた。

B 研究方法

スクレイピー感染マウス脳組織、羊スクレイピー脳組織、本邦で摘発された BSE の橋を用いた。BSE 材料はホルマリノ固定後蟻酸処理、他は通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切標本を作製した。

標本は脱パラフィン後、次の 5 種類の方法で前処理を行った。1) 98%蟻酸処理 5 分 (FA)、2) 121°C オートクレーフ 20 分 (121DWHA)、3) 121DWHA の後、98%蟻酸処理 1 分 (121DWHA/FA)、4) 135°C オートクレーフ 20 分 (135DWHA)、5) 135DWHA の後、98%蟻酸処理 1 分 (135DWHA/FA)。それぞれの前処理後、免疫組織化学的染色を実施した。-

次抗体は表 1 に示す市販抗体を含む 17 抗体を使用した。

なお、当該研究は病理組織材料及び BSE 確認検査材料を用いた研究であり、倫理面の問題は無い。

C 研究結果

17 抗体のうち、反応性の代表的なものについて表 2 に示した。抗 PrP ポリクロナール抗体 (pAb) B103、連続エピトープを認識するモノクロナール抗体 (mAb) 43C5 に対しては 135DWHA、135DWHA/FA は 121DWHA あるいは 121DWHA/FA 法より優れた抗原賦活化法であった (図 1)。また、動物種特異性を示したか、連続エピトープを認識する mAb118 も同様に 135DWHA、135DWHA/FA が適していた。一方、非連続エピトープを認識する mAb44B1 では 121DWHA/FA がいずれの動物種に対しても抗原賦活化法として優れ、135DWHA や 135DWHA/FA 法は非連続エピトープを認識する抗体には抗原賦活化法として適さなかった (図 2)。

また、mAb43C5 を用いた 135DWHA、135DWHA/FA 法は 6 か月以上の長期間ホルマリンに浸漬していた羊スクレイピー標本の抗原賦活化にも有効であった。

種特異的抗体は mAb31C6, 118, 12F10, 147 であった。mAb3F4 はヒト recPrP に対する抗体で、いずれの動物種についても陽性シグナルを得ることかできなかったことからヒト特異的抗体であると考えられたか、今回確認できなかった。mAb31C6 (図 4), 118, 147 はスクレイピー感染マウスのみで陽性を示し、12F10 ではマウス陰性、BSE、羊スクレイピーで陽性シグナルが得られた。また、mAb6H4 ではいずれの感染動物組織にも陽性が得られた (図 4)。

D 考察

プリオン染色のための免疫組織化学的抗原賦活化法は北本らにより開発された 121°C オートクレーブ法を基本として、いくつかの追加処理を加え利用されている。しかしながら、感染性の不活化のための蟻酸処理は著しく抗

原性を損なわせ、種々の処理の追加も期待したほどには賦活化が得られない場合が多い。本研究で新しく改良した 135°C 法は操作が簡便であることに加え、連続エピトープを認識する抗体ではこれまでに報告のある方法と比較して優れた抗原賦活化法と考えられた。一方、非連続エピトープを有する抗体では 121DWHA/FA が抗原賦活化法として適し、135°C 法単独では陰性、135°C 法に蟻酸処理を加えることで陽性シグナルが得られた。オートクレーブ法を含む免疫組織化学的抗原賦活化法の原理の一つとして、抗体の反応性は組織切片上にある抗原の構造変化によることか報告されている。今回得られた結果から、オートクレーブ処理と蟻酸処理では抗原賦活化作用が異なる可能性と 135°C オートクレーブによってプリオン蛋白の立体構造上のエピトープが部分的に失われる可能性が推察された。

抗体の種特異性に関して、mAb31C6, 118 の結果からこれら抗体ではトリプトファンか、mAb12F10 ではチロシンか、それぞれ抗体が由来する動物種特異性を規定しているように考えられた。しかしながら、牛 recPrP に対する抗体である mAb6H4 は、mAb31C6 と同じ部位を認識し、mAb12F10 が種特異性があることから、種特異性であることか期待されたか、いずれの動物に対しても陽性を示した。このことから、免疫組織化学的には mAb6H4 はチロニンに規定されないエピトープに依存していることか考えられた。つまり、抗体のエピトープ領域の中で、免疫組織化学的抗原抗体反応はエピトープ領域全てが関与するのではなく、限定されたコア領域に依存する可能性があることか推察された。

E 結論

免疫組織化学的検索のための抗原賦活化法として今回検討を行った 135°C オートクレーブ法は、連続エピトープを認識する抗体については従来の抗原賦活化法より感度の点で優れていた。しかしながら、非連続エピトープを認識する抗体では本法は有効でなく、抗体の特性にあった抗原賦活化法の選択が必要と

考えられた。また、免疫組織化学的方法でみられる抗体の種特異性は抗体エピトープの限定されたコア領域に依存することか示唆された。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

Okamoto M, Furuoka H, Horiuchi M, Noguchi T, Hagiwara K, Muramatsu Y, Tomonaga K, Tsuji M, Ishihara C, Ikuta K, Taniyama H
Experimental transmission of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in the small intestinal epithelial cells of neonatal mice Vet Pathol, 40 723-727, 2003

2 学会発表

藪舩敦史, 古岡秀文, 堀内基広, 横山 隆, 品川森一, 佐多徹太郎 動物プリオン病の免疫組織化学的染色における抗原賦活化法の検討 第135回日本獣医学会(東京) 2003, 4

表 1

Antibodies	Epitope Position	Clonality L/DC	Clonality	Immunogen	Source
110	56-90	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
132	119-127	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
T1	137-143	L	mAb	Mouse recPrP	Tagawa
118	137-145	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
31C6	143-151	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
149	147-153	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
43C5	163-169	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
147	219-229	L	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
72	89-231(143-151)	DC	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
44B1	155-231	DC	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
44B2	155-231	DC	mAb	Mouse recPrP	Horiuchi
T2	unknown	DC	mAb	Mouse recPrP	Tagawa
B103	103-121	L	pAb	Cow recPrP	Horiuchi
6H4	155-163	L	mAb	Cow recPrP	Prionics (Zurich, Switzerland)
F89/160 1 5	146-157	L	mAb	Cow recPrP	Affinity Bio Reagents (CO, USA)
3F4	109-112	L	mAb	Human recPrP	Chemicon (CA, USA)
12F10	142-160	L	mAb	Human recPrP	Cayman Chemical(MI, USA)

L linear epitope, DC discontinuous epitope

表 2

antibodies	B103 (pAb)			43C5 (mAb,L)			118 (mAb,L)			44B1 (mAb,DC)		
	M	B	S	M	B	S	M	B	S	M	B	S
FA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
121DWHA	+	+	+	2+	+	+	-	-	-	+	+	-
121DWHA/FA	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-	-	3+	2+	2+
135DWHA	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-	-	-	-	+
135DWHA/FA	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-	-	2+	-	+

pAb polyclonal antibody, mAb monoclonal antibody

L linear epitope, DC discontinuous epitope

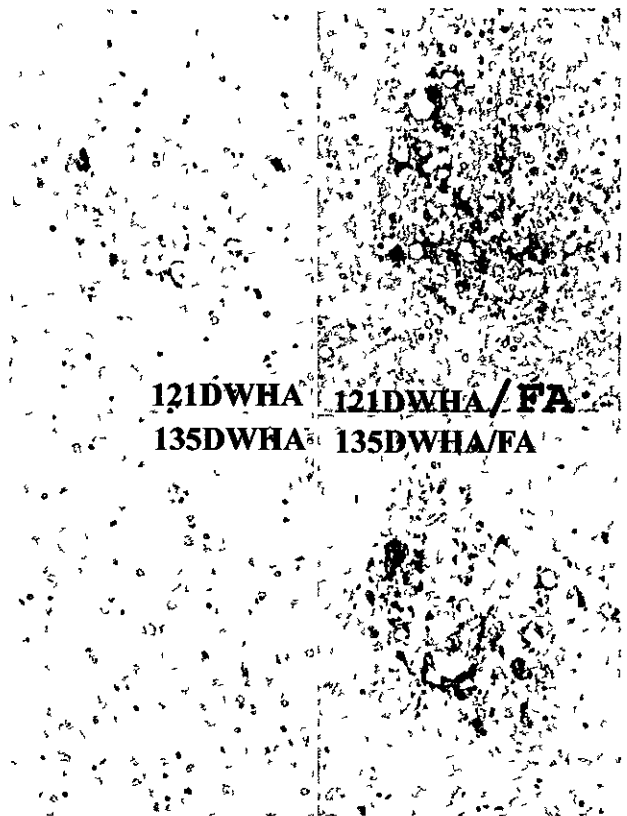
M mouse scrapie, B BSE cattle, S sheep scrapie

☒ 1



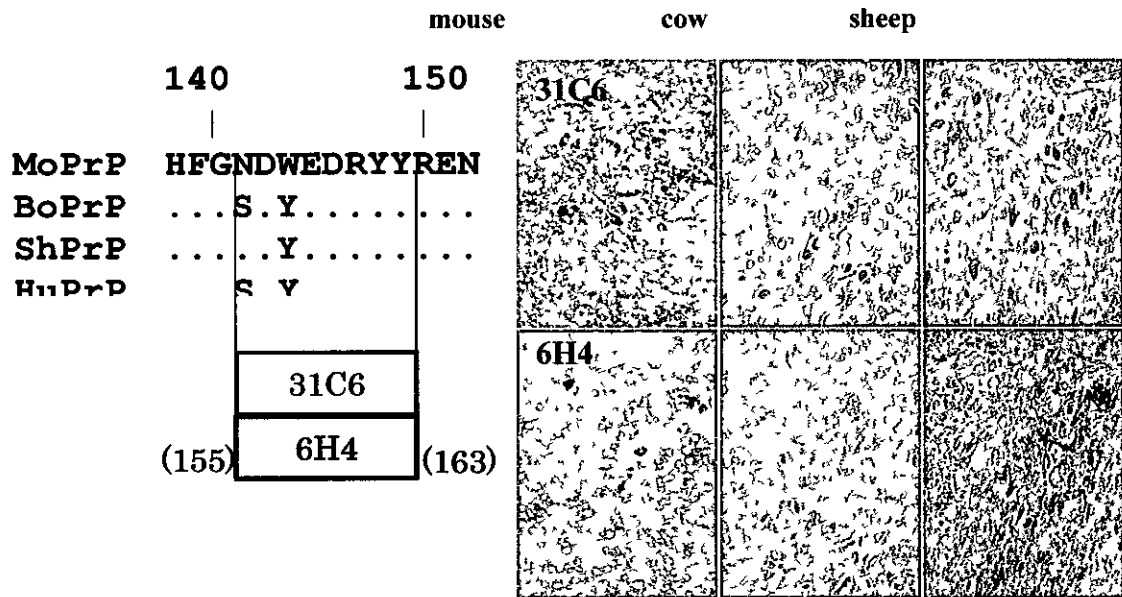
43C5(mAb,L)

☒ 2



44B1(mAb,DC)

☒ 3



14. ウシ海綿状脳症の感染・発症機構の解明

—マイクロアレイによる早期診断および感染・発症機構の解明—

分担研究者 三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科助教授

研究要旨 プリオン病の早期診断および感染・発症機構を解明するための方法として、マイクロアレイによる発現遺伝子プロファイリングを試みた。脾臓および脳では、プリオン〔異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を含む脳乳剤〕接種に伴う遺伝子発現プロファイルに、経時的なすれ及び類似性が認められ、各々の組織で生じる PrP^{Sc} への異常化を反映している可能性があることを示した。一方、血液中の細胞の遺伝子発現プロファイルでは、意義は明らかではないが、調べた限り全ての時期でプリオン接種に伴い顕著に発現が増強するものがあった。マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルは、プリオン病の早期診断あるいは発症機構の解明に有用な臨床分子病理学的方法として更に検討する意義があると考えられる。

A 研究目的

プリオン病の患者や患者は臨床症状及び死後の病理検査などにより組織中の PrP^{Sc} を検出することで（確定）診断されている。また有効な治療法はないか、将来的には早期に診断を行い、脳神経変性疾患や痴呆症等、他の疾患と鑑別する必要がある。また、屠殺以前に患者を診断できれば、抵抗性の高い PrP^{Sc} による食肉検査所や器具の汚染を防止し、感染源の拡大を防止できる。しかしながら、プリオン病原体は PrP^{Sc} そのものであり、ゲノムを持つ病原微生物を原因とする感染症と異なり、高感度 PCR を応用できない。同時に液性・細胞性免疫の反応は見られないことも併せて、殊に家畜では、生存個体レベルでのプリオン病診断は困難である。

今回の研究では、少なくとも感染初期には PrP^{Sc} の増幅を含めて生体側が特異的な反応を示すことを仮定して、PrP^{Sc} 接種したマウスの血液中の細胞（リンパ球やマクロファージ）および脾臓、脳などでマイクロアレイにより網羅的・包括的に遺伝子の発現を解析し、プリオンの伝播・正常型プリオンタンパク (PrP^C) の異常化に伴う特徴的なプロファイルの探索を試みた。また、この手法が、PrP^{Sc} への構造変換に直接関与する分子だけでなく、早期診断あるいは発症機構の解明に有用な分子（群）を追跡す

るための臨床分子病理学的方法として有意義が評価することを目的とした。

B 研究方法

遺伝子発現プロファイリングでは、まず、C57BL/6 マウスの脳及び腹腔内に、各々 20µl および 50µl の福岡 1 株 10% 脳乳剤あるいは対照として正常マウス脳乳剤を接種した。それから 2 日および 10 日、30 日後に安楽死させ、採取した血液および脳、脾臓から TRIZOL を用いて mRNA を抽出・部分精製した。次に、この mRNA を蛍光標識し、DNA チップ（マウス完全長 cDNA テータヘース「FANTOM」を中心に、「MGI」「DDBJ」の 3 つの公共データベースを活用し開発され、機能既知・機能推定の 6400 遺伝子を搭載する。Oligo Size 60mer Feature Size 140~160µm House Keeping Gene β-actin, α-tubulin, Ribosomal Protein S19, GAPDH, transferrin receptor）を用いてハイブリタイゼーションを行い、得られたテータから Cy5/Cy3（＝福岡 1 株脳乳剤/正常マウス脳乳剤）を標準化し差が 20 以上のものを選択しクラスタリング解析などを行った。

（倫理面への配慮）

全ての動物実験は、名古屋市立大学大学院医学研究科および九州大学大学院医学研究院の動物実験指針に従って行われた。

C 研究結果

表1に今回のマイクロアレイ解析(図1)で一度でも発現の変動(Cy5/Cy3の絶対値が20以上のもの)があった遺伝子の数を示した。6,400のうち合計2,694の遺伝子か変動を示したか、他の2臓器に比較して、脳で発現か変動する遺伝子の数は少なく約1/4程度であった。また、脳や脾臓では福岡1株脳乳剤を接種した場合、正常マウス脳乳剤を接種した場合に比較して、発現か増強する遺伝子 発現か減弱する遺伝子の比が1.3前後であったか、血液中の細胞では5.6と発現か増強した遺伝子も多かった。また、発現の変動している遺伝子は血液細胞および脳では2日>30日>10日、一方脾臓では10日>30日>2日であった。図1では脳で発現する遺伝子の数は2日より10、30日で増加しているように見えるか、対照の遺伝子発現も高くなるため変動した遺伝子数としては結果的に少なくなった。また、クラスタリング解析により、血液の全ての時期や脳および脾臓の2日目のプロファイルは、各々の間でも、またその他のプロファイルとの類似性が低かった。それに比較して、脾臓および脳の10、30日目の遺伝子の発現プロファイルは明らかに近傍にあり、類似性が見られた(図2)。そこで、PrP^{Sc}の増幅される時期を考慮し10日目の脾臓と30日目の脳のプロファイルと比較し、共通して変動を示す約30程度の遺伝子を選択し図3に示した。

D 考察

プリオン病は、PrP^Cか高次構造の変換によりプロテアーゼに抵抗性になり不溶化 凝集化したPrP^{Sc}が主に中枢神経系に蓄積することか原因とされている。発症時には、他の脳変性疾患等と共通のプロファイルを示す可能性はあるか、プリオン感染・伝達の初期には特異的な遺伝子発現パターンが観察されることか期待される。そこで今回、マイクロアレイにより、個々の遺伝子に限定せずプリオンの接種に伴い早期に変動を示す遺伝子プロファイルを探索した。対象臓器として、最も病理学的変化の著しい脳、あるいは最も早期にPrP^{Sc}が出現する脾

臓を用いる一方、体内に入ったPrP^{Sc}は移行すると考えられる点、さらに診断という側面から血中の細胞(リンパ球やマクロファージなど)を利用した。また、早期診断および感染 発症機構の解明を念頭に、これまでの研究で把握されている接種後の経過と病理像から遺伝子発現プロファイリングの時期を設定した。

クラスタリング解析の結果、脳と脾臓で類似性が見られること、さらに脳よりも脾臓で早期から発現遺伝子の変動することなどは、PrP^{Sc}が増幅される臓器および時期を反映することを推測させた。また、血液中の細胞の遺伝子発現プロファイルでは、調べた限り全ての時期でプリオン接種に伴い Transmembrane 9 superfamily member 2 遺伝子の発現が著しく増強した。チャンネルあるいは小分子のトランスポーター膜タンパクと考えられるか意義は不明である。

プリオンを接種されたマウスの反応として、接種に伴う反応、あるいは、PrP^{Sc}の増幅や α -ヘリックスから β -シートへの構造変換に関与する分子に加え、異常タンパク反応および翻訳の低下、小胞体関連分解の促進、アポトーシスなどのnon-nativeタンパクに対応するものか予想される。WW/Rsp5/WWトメインを持つタンパクは β -シート構造を安定化させることか知られているか、少なくとも脾臓で変動を示す7遺伝子のうち6種は予想に反して発現か減弱していた。また、異常タンパク反応として顕在化すると思われたシャペロン遺伝子あるいはユーヒキチン化などに伴う遺伝子の発現は増強するものは少なく減弱するものか多かった。図3に示した10日目の脾臓および30日目の脳の両組織で変動を示す約30程度の遺伝子の中にも前述のように予側された範疇に含まれるものかあるか、その発現はいずれも増強するより減弱する傾向を示した。個々の遺伝子にはついては、以前のサフトラクノン法やdifferential display法により伝達機序や構造変換に関わる遺伝子(産物)の検索によって報告されたものとの一致は見られていない。

今後、感受性の異なるマウスあるいはプリオン株を用いて遺伝子発現プロファイルを比較

解析する予定である。また、今回脳での発現変動が小さかったことから、プリオン接種後、採材までの期間を延長して比較する必要はある。さらに、直接PrP^{Sc}が増幅される細胞のみならず、その影響を受けた周辺の細胞に見られる特異的な遺伝子の変動を検出するためには、必ずしも均一な細胞集団を用いる必要はないものの、PrP^{Sc}を増幅するScN2a神経芽細胞腫にpentosan polysulfateで治療処置を施し、その前後のプロファイルを均一な培養細胞系で比較する予定である。

E 結論

脾臓および脳では、プリオン接種に伴う遺伝子発現プロファイルに時間のずれを示しながら類似性があり、各々の組織で生じるPrP^{Sc}への異常化を反映している可能性があることを示した。一方、血液中の細胞の遺伝子発現プロファイルでは、調べた限り全ての時期でプリオン接種に伴い顕著に発現が増強するものがあったか、意義は不明である。マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルは、プリオン病の早期診断あるいは発症機構の解明に有用な臨床分子病理学的方法として更に検討する意義がある。

以上は、名古屋市立大学 宮本智美衛生技師、および東北大学・岡村匡史助手、村本環助教授、九州大学・毛利資郎教授との共同研究である。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Gombojav A, Shimauchi I, Horuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, Kitamoto T, Miyoshi I, Mohri S, Takata M Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie J Vet Med Sci 2003, 65(3) 341-347
- 2) Sato Y, Terada Y, Utsunomiya H, Koyanagi Y, Miyoshi I, Sasano H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of human ovarian cortex into NOD-SCID mice Mol Reprod Dev 2003, 65(1) 67-72
- 3) Okamura T, Miyoshi I, Takahashi K, Mototani Y, Ishigaki S, Kon Y, Kasai N Bilateral congenital cataracts result from a gain-of-function mutation in the gene for aquaporin-0 in mice Genomics 2003, 81(4) 361-368
- 4) Hagiwara K, Nakagawasa O, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Tan-No K, Tadano T, Yanagisawa T, Iijima T, Murakami M Analgesic action of loperamide, an opioid agonist, and its blocking action on voltage-dependent Ca²⁺ channels Neurosci Res 2003, 46(4) 493-497
- 5) Murakami M, Xu F, Miyoshi I, Sato E, Ono K, Iijima T Identification and characterization of the murine TRPM4 channel Biochem Biophys Res Commun 2003, 307(3) 522-528
- 6) Murakami M, Yamamura H, Suzuki T, Kang M-G, Ohya S, Murakami A, Miyoshi I, Sasano H, Muraki K, Hano T, Kasai N, Nakayama S, Campbell KP, Flockerzi V, Imaizumi Y, Yanagisawa T, Iijima T Modified cardiovascular L-type channels in mice lacking the voltage-dependent Ca²⁺ channel β 3 subunit J Biol Chem 2003, 278(44) 43261-43267
- 7) 三好一郎, 毛利資郎, 笠井憲雪, 北本哲之 ヒトプリオンに高感受性を示す遺伝子改変マウスの開発 最新医学 58(5) 1026-1034, 2003

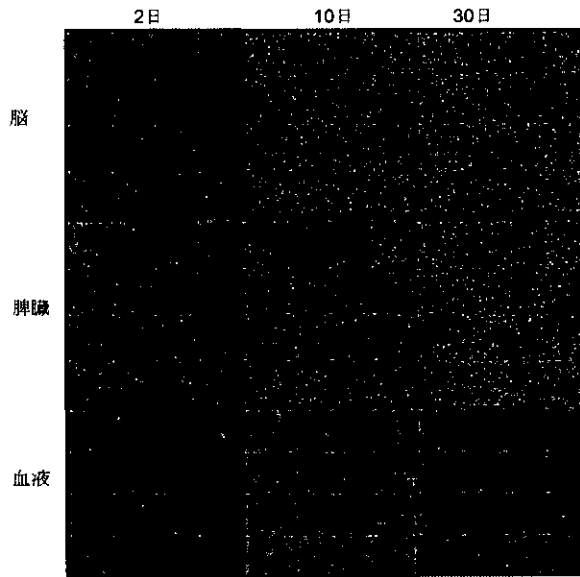


図1 プリオン接種後の遺伝子発現プロファイル

表1 発現の変動した遺伝子

組織	合計	増強	減弱
脳	373	91	321
脾臓	1472	394	1087
血液	1570	734	891

プリオン接種後2 10 30日後に一度でも発現の変動を示した遺伝子の数。
(全体では2694/6400)

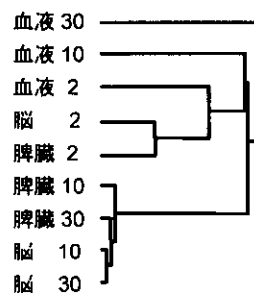


図2 遺伝子発現プロファイルによるクラスタリング解析

-4 16 0 4 16
 Test/Control

