

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

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16年度 総括・分担研究報告書

平成17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 16 年度食品の安全性高度化推進研究事業
「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」
班員名簿

氏 名	所 属	職 名
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部 長
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座	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
山河 芳夫	国立感染症研究所細胞化学部	室 長
松田 治男	広島大学大学院生物圏科学研究科	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超分子分光分野	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	主任研究官
松田潤一郎	国立感染症研究所獣医科学部	室 長
石黒 直隆	岐阜大学応用生物科学部食品環境衛生学教室	教 授
古岡 秀文	帯広畜産大学畜産学部獣医学科病態獣医学講座	助教授
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
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	教 授
扇 勉	北海道立畜産試験場畜産工学部	部 長
寺尾 恵治	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター	センター長
高橋 秀宗	国立感染症研究所感染病理部	室 長
佐々木裕之	埼玉県中央食肉衛生検査センター	所 長

目 次

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 16 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）	
1. 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）	
2. 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）	
3. 我が国の BSE プリオンの生物学的性状の解析	17
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）	
4. 末梢神経における異常型プリオンタンパク（PrP ^{Sc} ）の検出及び ELISA, WB, BioAssay による PrP ^{Sc} の検出感度の比較	21
分担研究者：山河 芳夫（国立感染症研究所細胞化学部）	
5. 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）	
6. 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）	
7. 蛍光相関分光法を利用した BSE 診断の全自動化システムの構築	31
分担研究者：田村 守（北海道大学電子科学研究所）	
8. プリオンの増殖に関与する補助因子の探索	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）	

9. プリオン蛋白の細胞内動態と食品試験への応用	37
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）	
10. 高感度バイオアッセイ系の開発	41
分担研究者：松田潤一郎（国立感染症研究所獣医科学部）	
11. 動物プリオンタンパクの遺伝子解析	45
分担研究者：石黒 直隆（岐阜大学応用生物科学部食品環境衛生学教室）	
12. 動物プリオン病の病理学的診断に関する研究	51
分担研究者：古岡 秀文（帯広畜産大学病態獣医学講座）	
13. ウシ海綿状脳症の感染・発症機構の解明	55
分担研究者：三好 一郎（名古屋市立大学大学院医学研究科）	
14. トランスジェニック培養細胞株を用いた感染実験解析	57
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）	
15. 疑似患者を用いた発症前のプリオン動態	61
分担研究者：扇 勉（北海道立畜産試験場・畜産工学部）	
16. カニクイザルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発	65
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）	
17. BSE モデル動物を用いた病理学的解析	69
分担研究者：高橋 秀宗（国立感染症研究所感染病理部）	
18. 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	73
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

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。それぞれの課題に対し研究はほぼ順調に進展し、成果が得られた。BSE牛の検査と解析については、ほぼ世界レベルないしそれ以上に達した。蓄積されつつある研究資源は分担研究者間で相互利用が行われ、共同研究を加速した。その結果、わが国のBSE研究のベースができ、今後の研究の発展が期待できる。

分担研究者（17名）

古岡 秀文 帯広畜産大学病態獣医学講座・助教授
堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科・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 岐阜大学食品環境衛生学教室・教授
松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科・教授
千葉 丈 東京理科大学基礎工学部・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・教授
菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部・主任研究官
山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部・室長
三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科・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・教授
高橋 秀宗 国立感染症研究所感染病理部・室長
扇 勉 北海道畜産試験場畜産工学部・部長
寺尾 恵治 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター・センター長
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、食肉の安全を図るために食肉衛生検査所で全頭検査が始まり、平成17年3月までに計11頭が摘発され、端緒となった1例と最近までの死亡牛検査で計4頭が農水省の家畜保健衛生所で発見され、わが国では現在15頭のBSEが見つかったことになる。BSEが原因と考えられるヒトの変異型クロイツフェルドヤコブ病(vCJD)は、わが国では平成17年2月に英国での曝露と考えられる50才台の邦人男性例が診断

された。英国等世界では現時点で計169例見つかっており、食品や輸血分野のみならず、BSE等のプリオン感染症対策は緊急的重要課題である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目的で、基礎および応用面から共同して総合的に研究を行う。これらを通して、プリオンの免疫化学的、病理学的およびバイオアッセイによる検査法、プリオン不活化法、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ド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プリオンはバイオセーフティレベル2の病原体で、BSEプリオンをウシプリオン遺伝子改変マウスやサル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。実際、抗プリオン抗体や BSE 脳乳剤の提供、病理、ウエスタンブロット、そして Tg マウス解析などの共同研究が行われた。種のバリエーション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。本研究班で、牛プリオン遺伝子改変マウスの作製と感染実験で一部の結果がでた。またサルやウシでの経口および脳内接種による感染実験がスタートしているが、いまだ途上で、来年度以降の発症の可能性が考えられる。それぞれの詳細な研究方法は分担研究者の報告書に譲る。

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：

プリオン特異抗体の開発と検討（松田(治)、千葉）、病理組織での検出方法の検討と解析（佐多）、プリオン蛋白質検出のための ELISA 法およびウエスタンブロット法の検討と解析（山河）、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とプリオン遺伝子発現（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：

近交系マウスおよび Tg マウスを用いた解析（品川）、遺伝子改変マウスによるバイオアッセイ系の開発（松田(潤)）、牛、サル等の実験動物モデルの作製（扇、寺尾）と解析（山河、佐多）、スクレイピー脳病理変化の解析（古岡）、プリオン感受性解析を目的とした牛 PrP 遺伝子型の検討（石黒）、プリオン蛋白質の構造変化の解析（堀内）、プリオン産生細胞でのマイクロアレイ法による遺伝子解析（三好）、プリオン増殖に関与する補助因子の解析（堂浦）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、高橋）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：

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地的な検討が不可欠である。本年度も、全国食肉衛生検査所協議会の会員に協力を求め、GFAP を指標

とした食肉汚染状況および総合的な検討で、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づいて行う。「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、実験動物の使用を最小限にするとともに、取り扱いや処理には動物愛護の精神を持って臨む。またプリオンの取り扱いは、国立感染症研究所におけるバ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

① BSE 確認検査のうち病理・免疫組織化学法を 7 時間で終了する迅速検査法を昨年度開発し、本年度に実際の確認検査等の検体で評価した結果、使えることが判明した。また新規の高感度免疫組織化学法 immuno-AT tailing 法を開発し、さらに検討中である（佐多）。

② わが国で摘発され脳組織が得られた BSE3 例からほぼ均質な 10% 乳剤を作製し、性状解析し、研究に必要な各分担研究者に提供した。またわが国で市販されつつある ELISA キット 2 種について同じ乳剤を用いて評価し、現在使われているプラテリアとほぼ同等以上の検出感度があることがわかった。確認検査に使われているウエスタンブロット法の検出感度は ELISA 法の 50 倍程度であることが判明した。神奈川 BSE2 例目の末梢神経組織から PrP^{Sc} が検出でき、その程度は脊髄の 1/1,000-1/3,000 と考えられた。また背根神経節には脊髄の 1/10 程度の PrP^{Sc} の蓄積があった（山河）。この背根神経節のほとんどに外套細胞および神経節細胞に沈着したプリオンを免疫組織化学で検出できたが、末梢神経は陰性であった（佐多）。

③ 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、モノクローナル抗体を作製した。繰り返し配列にあるエピトープを認識し、神経細胞膜上の PrP^{Sc} を認識するが細胞質内の PrP^{Sc} は認識しなかったため、細胞質内ではこのエピトープを欠く PrP^{Sc} の存在が明らかとなった（千葉、堀内、山河、佐多）。

④ 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）。

- ⑤ コンパクトな蛍光相関分光法測定装置が完成し、自動計測システムの試作が完了した。さらに高感度化が可能な蛍光相互相関法の導入をおこなった（田村）。
- ⑥ 培養細胞からの標準陽性サンプルの開発はできなかったが、この細胞でのプリオンタンパク質の発現解析から新たな PrP 発現機構の存在が示唆された（菊池）。

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

- ① わが国で初めて発見された BSE 千葉例のプリオンを近交系マウスに接種した結果、継代 5 代目で潜伏期間が約 400 日から 160 日まで短縮できた。BSE プリオンのウエスタンブロットのパターンは保たれていた。と畜検査で摘発された BSE 1 頭目から 6 頭目については、脳内接種してから 415 日から約 500 日後に発症し死亡した。米国から輸入したウシ遺伝子改変マウスでの感染実験の結果、およそ 240 日で発症した。ほかの国内 BSE 例については実験継続中である（品川、堀内）。
- ② またマウス・ハムスター PrP のキメラマウスへの伝達試験により、BSE のハムスターに対する種の壁に関与するプリオン遺伝子の領域を同定した（品川）。
- ③ ウシプリオン発現 Tg マウスを 4 系統作出し、遺伝子導入部位を同定した。Tg#39 マウスでは接種後約 100 日で脾臓に、200-300 日で脳にプリオンが検出できたが、脳のプリオン量は少なかった。このマウスでは最低感染重量は $1.25 \mu\text{g}$ で、和歌山例の 10% 脳乳剤 1ml には 8×10^4 感染価のプリオンがあることがわかった。バイオアッセイ系としての検出感度はウエスタンブロット法に匹敵し、現行 ELISA 法の約 80 倍の感度を持つと考えられた（松田潤、山河、高橋、佐多）。
- ④ 2004 年 1 月から 9 月までに BSE プリオンを脳内接種した 18 頭の牛を経過観察中である。また疑似患者のうち 9 頭を鑑定殺したが、プリオンは検出できなかった。また血液や髄液の検査では異常値はえられなかった（扇）。
- ⑤ カニクイサルへの接種実験では、経口接種 3 頭、脳内接種 3 頭について経過観察しているが、15 ヶ月後で軽度の行動異常がみられ、脳波所見にも軽度の異常が見られるようになった。対照と比較すると、接種群では体重増

加率が低い傾向がみられた（寺尾）。

- ⑥ ウシの PrP 遺伝子多型についてホルスタイン 863 頭、黒毛和牛 186 頭で検討した。Exon 1 近傍の多型解析は Exon 1 上流の 23bp の挿入/欠失変異と Exon 1 下流の 12bp の挿入/欠失変異であり、ホルスタインでは 23bp 挿入/欠失変異はホモで欠失しているのが 70% であるのに比べ、和牛ではホモの欠失は少なく、ヘテロの挿入/欠失変異 (61%) を多く保有していた。12bp 挿入/欠失変異に関してもホルスタインではホモの欠失が多いのに比べ、和牛ではヘテロの変異が多かった。ORF 内のオクターリピートはホルスタインおよび和牛とも 6 回のリピートが 90% を占め、5 回のリピートのホモはホルスタインではわずかに 4 頭であった。和牛においても ORF 内の変異部位はホルスタインと同様に 234 番と 576 番の DNA 部位のみであり、新たな DNA 変異は検出されなかった。DNA の塩基置換をホルスタインと和牛のアリルで比較すると、両種には大きな違いが検出された。わが国の BSE 牛 6 頭では、特異的な変異部位はなく、Exon 1 近傍の変異箇所についても大きな特徴は見出されなかった（石黒）。
- ⑦ スクレイピーマウスの空胞変性、プリオンの蓄積、グリア細胞の活性化機構についてサイトカインの動態を調べた結果、IL-12, MCP-1, MCP-5 が脳組織から検出でき、免疫組織化学でも病変部に一致して発現が確認でき、これらサイトカインの病態形成への関与が示唆された（古岡）。
- ⑧ 液化エチレンオキシド (LEO) 処理および高温高圧処理によるプリオン不活化に伴う PrP^{Sc} 分子の変化について解析した。0.7% LEO 処理ではプリオン感染価は未処理の 2% まで減少し、B103 抗体により検出される PrP^{Sc} は量的に感染性の減衰と同じ割合で減少した。一方、mAb31C6 で PrP^{Sc} を検出した場合は、PrP^{Sc} の減少は未処理対照と比較して最大でも 60% 程度であった。従って、PrP^{Sc} 分子の分解のみならず、特定のアミノ酸の修飾もプリオンの不活化に関与すると考えられた。一方、熱処理による PrP^{Sc} 分子の変化は検出に用いた抗体すべてで同様であった。従って、熱処理では PrP^{Sc} 分子の加水分解がプリオン不活化に関与すると考えられた。（堀内）。
- ⑨ プリオンの複製増殖に関与する補助因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞を用いて RNA 干渉による遺伝子スクリーニング

を行った。140 個の遺伝子の解析を終了し、異常型プリオン蛋白の発現を抑制する 7 個の遺伝子と、異常型プリオン蛋白の発現を亢進する 1 個の遺伝子を確認した。(堂浦)。

- ⑩ 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プリオン発現培養細胞で発現遺伝子プロファイリングを行った。発現の変動した遺伝子を同定したが、マウスの実験との共通性や PrPSc の増幅機序と CR によるその阻害機序でも異なっていた (三好)。
- ⑪ 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。マウスプリオン遺伝子導入細胞にスクレイピー株を感染させた結果、一過性増殖がみられた (小野寺)。
- ⑫ マウスから神経幹細胞を分離培養し、スクレイピープリオンと共培養したところ、プリオンの増幅を示唆する所見が得られた。またマウスプリオン遺伝子ノックアウトマウスから神経幹細胞を樹立し、外来性プリオン遺伝子を発現させた (高橋)。

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

- ① 中枢神経系組織の細胞マーカーであるグリア繊維性酸性タンパク (GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein) の残留について、全国各地の 9 と畜場で処理された牛枝肉及びブロック肉、さらに一般に流通している市販牛肉を対象として ELISA 法で調査した。施設によっては、と畜場における洗浄後の牛枝肉、カット工場処理された牛ブロック肉から GFAP が検出され、脳・脊髄組織が残留しているものと思われた。市販牛肉は、不検出であった。脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するには、枝肉の背割りを正中線から左右どちらかにずらすことが最も効果的であった。これが不可能なときは、枝肉に水を流しながら背割りを行い、その後自動高圧洗浄装置により枝肉全体を洗浄、さらに手動の高圧洗浄機により脊髄周囲を重点的に洗浄すること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

BSE プリオンと反応する新規モノクローナル抗体を 2 種以上開発し、そのうち 1 種は繰り返し配列由来のエピトープを認識し、細胞内プリオン

動態の一部を明らかにした。診断系への応用はこれから着手することになる。わが国の BSE 例から参照品を作製し、性状解析が終了した。現行の ELISA 法との感度比較が可能となり、本年度は国内 2 社のキットについて評価ができた。今後開発されるキットの評価に使用可能である。新規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および自動化が完成し、データを取る準備ができたので、今後が期待できる。確認検査で使われる病理・免疫組織化学法の改良が進み、迅速化と実用化が可能となった。また高感度化を目指した新規検出法も開発された。ウエスタンブロット法の検出感度が明らかとなり、実際の診断に応用され、神奈川 BSE2 例目の検討で末梢神経からプリオンを検出した。BSE 死亡牛の末梢神経からも微量検出されている。牛プリオン遺伝子組換えマウスが 4 系統作出され、性状解析がほぼ終了した。うち 1 系統は脾臓での蓄積を指標とした伝達性の確認には使用可能であるが、脳内蓄積は不十分で、研究資源として BSE プリオンの供給には至らなかった。プロモーターの変更が必要と考えられる。

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

わが国で摘発された BSE6 頭目までについて近交系マウスへの伝達性が明らかとなった。初代では約 400-500 日までに発症した。千葉例については継代を繰り返すことにより潜伏期間は短縮したが、継代後もほぼ性状は維持され、英国由来の BSE と類似していた。これらの株化が進めば今後の BSE 研究の資源となる。ほかの例については実験継続中である。米国から輸入した牛プリオン遺伝子改変マウスの脳内接種では 240 日で発症したので、このマウスを使った研究も今後開始できる。サルやウシへの感染実験が行われているが、いまだ発症しておらず経過観察中である。牛では来年度後半以降、サルでは 2 年後以降の発症が推測され、順調に観察データと検体の採取が進んでいる。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、研究の広がりを促進できるであろう。また研究資源の管理・配布の原則、そして分担研究者への研究材料分与についてマニュアルと書式を作製した。わが国のホルスタイン、和牛そして BSE6 例 (すべてホルスタイン) のプリオン遺伝子解析が終了し、変異や欠失が明らかとなった。BSE 例に特徴的な変異は認められなかった。この点は外国で報告されている結果と同じであった。また、基礎研究として、プリオン病の脳病変形成機序として脳内サイト

カインの活性化の結果がえられた。マイクロアレイ解析はいまだ初期段階にあるが、この両者により病態の解明が進むことを今後期待したい。ノックアウトマウスの神経細胞株や神経幹細胞にプリオン遺伝子を導入し *in vitro* での解析の準備ができ、一部の結果がでた。将来の培養細胞でのプリオン検出や解析が期待できる。プリオンの不活化機序としてアミノ酸修飾と加水分解が考えられる結果が得られ、今後の立体構造解析や不活化法の開発研究に重要なデータが得られた。また RNA 干渉を用いた増殖に係わる補助因子の解析がすすみ、また副次的に新たな PrP 発現機構の存在が示唆され、今後の研究成果が期待される。

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

と畜時における脊髄神経組織の食肉への汚染防止法の開発は SRM 除去とともに重要な問題である。今回の GFAP を指標とした脊髄の食肉への汚染評価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がっていくものと期待される。

E. 結論

プリオンの高感度・迅速検査法の開発、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、そして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いう本研究班の課題について初期の目的は概ね達成されたと考えられる。BSE 牛の検査と解析についてほぼ世界レベルに達し、研究資源の蓄積とともに、わが国の BSE 研究のペースができた。

F. 健康危険情報

BSE 陽性牛の末梢神経組織にプリオンが検出できた。その量は脊髄の 1/1,000-1/3,000 と考えられた。BSE 牛の脳、脊髄、三叉神経節、背根神経節、回腸、脾臓、眼にはプリオンが計 99.74% 沈着することが報告されているが、残りの 0.26% のうちの一部と考えられる。

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
1)横田博，堂浦克美：体外診断キット及び体外

診断方法。特願 2004-216510、2004 年 7 月 23 日
2) 竹中繁織,野島高彦,大塚圭一,堂浦克美：異常プリオンの電気化学的検出方法。特願 2004-287562、2004 年 9 月 30 日

3) 蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び／又は測定法、発明者：金城 政孝、堀内 基広、藤井 文彦、坂田 啓司、田村 守、上野 雅由、柳谷 孝幸、出願人：独立行政法人科学技術振興機構、富士レビオ株式会社、アメリカ、特願 2004-166440、2004 年 6 月 3 日。

4) 水溶性蛍光材料およびその製造方法、発明者：金城 政孝、田村 守、藤井文彦、坂田啓司、神隆、出願人：独立行政法人科学技術振興機構、日本、特願 2004-275675、2004 年 9 月 22 日。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

II. 分担研究報告書

1. 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、中島 典子、片野 晴隆、飛梅 実 (同・感染病理部)、
花木 賢一 (東大生命工学センター)、古岡 秀文 (帯畜大病態獣医)、
堀内 基広 (北大獣医プリオン病学)、土屋 耕太郎 (日生研)

研究要旨 昨年度開発した迅速包埋・迅速免疫組織化学法を、1年間のBSE確認検査の検体および保存検体を用いその有効性について、現在行っている方法と比較評価した。その結果、HE染色標本では髄鞘の軽度膨化と軽い好酸性染色傾向がみられたが、軽度の海綿状態も判別が可能で、免疫組織化学でもPrP^{SC}を問題なく検出することができ、使用可能であると評価された。また、免疫組織化学の高感度化を目的にimmuno-AT tailing法を開発した。染色条件等の検討を行った結果、4倍から100倍程度の感度増加が期待できることがわかった。さらに詳細な実験条件の検討が必要である。

A. 研究目的

わが国の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)を除去したのち延髄門部を採取して、食肉衛生検査所でELISA法によるスクリーニング検査が行われている。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、および延髄凍結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が判明する。しかし、病理組織および免疫組織化学検査は、形態保持を目的とした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、通常の労働時間ではほぼ1日半の工程を経て、翌日の午後1時に免疫組織化学の結果が判明する。作業時間はほぼ12時間で、世界で最速であるものの、実際には種々の観点から1日で結果が判明することが望まれている。そこで脳組織の迅速標本作製および迅速な病理・免疫組織化学検査が、現在のウェスタンブロット法と同じ1日で終了可能となる方法について検討し、より迅速な病理検査法を昨年度に開発した。十分な検体数での検討を行うため、1年間の確認検査で平行して本法の有効性について検討した。

さらに、非定型例や若齢牛の検体はウェスタンブロット法で陽性となっても免疫組織化学は陰性であったため、免疫組織化学の高感度化を目的として種々の方法を試みてきた。本年度にやっと高感度化のメドがついた方法を開発することができたので報告する。しかし諸条件の設定にはまだ時間がかかると思われる。

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検体を分与して頂いた。平成16年度の確認検査のうち22例について現在の方法と同様に採材した。当所に到着してから1時間の固定を行ったものはBSE陰性例で19検体計42ブロック、2週間から1.3年間固定したもの18検体計27ブロックである。またBSE陽性ウシの脳組織はアイルランドから輸入したものと国内陽性例の計19検体25ブロック、そして今年度の国内陽性例3例6ブロックを用いた(表1)。いずれもホルマリン固定され、以下の方法でパラフィンに包埋した組織標本である。

2) パラフィン包埋法

昨年度の報告した方法で、マイクロウェーブ包埋装置を用いて包埋した。

ウシ脳・延髄検体

	固定期間	検体数	ブロック数
BSE 陰性	2w-1.3y	18	27
	1h	19	42
BSE 陽性 (アイルランド・日本)	1y-1.5y	19	25
	1h(日本)	3	6

計		59	100

現行法、迅速法、固定後迅速法で比較検討

<表 1 >

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℃ 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。実際は、110℃で、1mM HCl/DDW で抗原賦活化を行った。抗プリオン抗体は、現在使われている T4 ペプチドウサギ抗体および 44B1 マウスモノクローナル抗体を用いた。免疫組織化学の反応には、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、ヘマトキシリンで核染を行った。

4) 高感度免疫組織化学法(Immuno-AT tailing 法)

アデニンとチミンの繰り返し配列(AT)を 15mer 合成したオリゴヌクレオチドを市販の抗ウサギないしマウス IgG 抗体に標識した。抗 PrP 抗体 (BO4, 1D12)を切片に反応させ洗浄した後に AT 標識した抗ウサギないしマウス抗体を切片に加え、digoxigenin 標識した dUTP(dig-dUTP)の存在下で DNA ポリメラーゼ反応により AT 配列を伸長させ dig-dUTP をとりこませた。その後に HRP 標識抗 dig 抗体を反応させ、DAB を用いた呈色反応を行った（間接法）。また抗 PrP^Cモノクローナル抗体 (BO4)に直接標識して同様に反応させた。直接法と間接法を組み合わせた反応系についても検討した。感度の比較対照として現在用いている Envision+法を使った。

（倫理面への配慮）

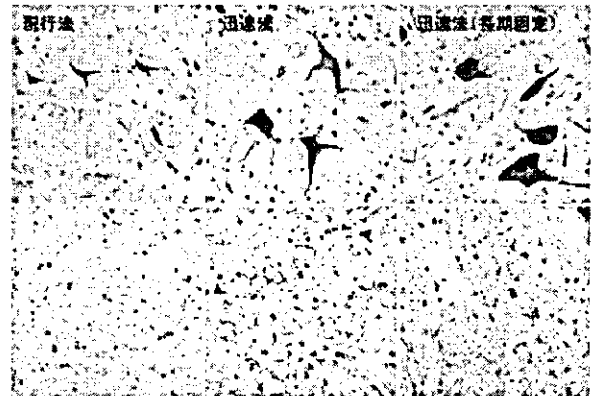
行政検査として行われている動物由来の検体である。また牛延髄標本は、牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し許可を得たものである。またアイルランドからの BSE 陽性検体は動物検疫所に申請し許可を得て輸入した。したがって倫理上問題はない。

C. 研究結果

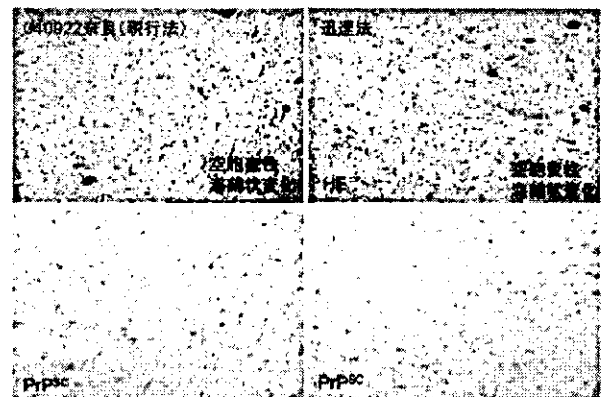
1) パラフィン包埋方法

昨年度に報告した方法と同じである。簡単に述べると、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、脱水過程を 4 工程、乾燥 1 分、パラフィン包埋 1 工程 33 分の計 2.1 時間とした。脱水後のパラフィン置換に際し乾燥工程の代わりに、キシレンを 40℃に加温し 20 分間の置換工程とした。このパラフィン包埋組織から作製した HE 標本を検討したところ、白質髄鞘の軽度の拡大がみられること、やや好酸性染色像が強いという違いが認められた（図 1）。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が可能であった（図 2）。固定時間が長い検体でも迅速包埋後の HE 染色像には大きな差異は認められなかった（図 3）。通常の脳組織は 1 週間固定し、十分な脱水後に包埋する。この方法で同じ延髄組織から作製した HE 染色標本とも大差は認められなかった。

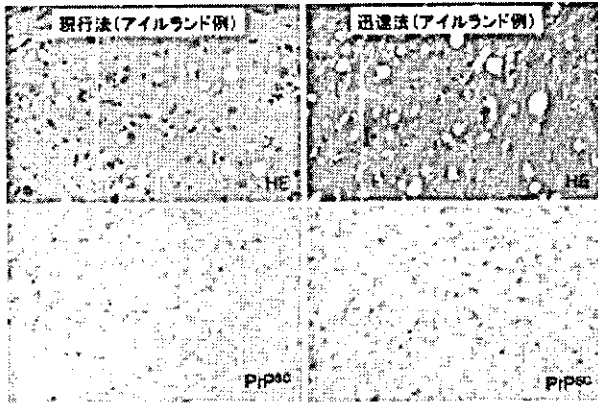
（図 1）



（図 2）



(図3)



2) 免疫組織化学法

マイクロウェーブによる免疫染色法は昨年度に報告した方法で行った。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分間行い、計約1時間で終了した。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るという利点がある。今回検討した標本でも非特異染色は認められなかった。プリオンの検出感度については、同じ抗プリオン抗体を同じ希釈倍率で、同時に免疫組織化学を行ってもほぼ同程度の強さでプリオンのシグナルが得られた。したがって検出感度には問題はなく、かえって非特異染色所見が低減するという結果となった。さらに、シナプトフィジンなど脳組織に特徴的な蛋白抗原の検出においても同程度に検出することができた。

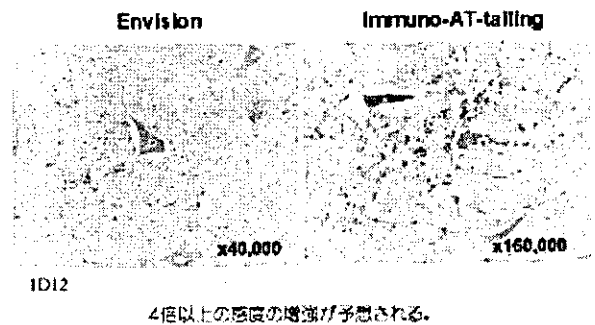
3) 高感度免疫組織化学法(Immuno-AT tailing 法)

1D12 モノクローナル抗体を用い、4, 8, 16 万倍希釈して国内 BSE 陽性例について Envision+と間接 Immuno-AT tailing 法でプリオンのシグナルを比較した。Envision+では4万倍希釈ではごくわずかなシグナルが得られたが、間接 Immuno-AT tailing 法では16万倍希釈しても図4にみられるように強いシグナルが得られた。したがって4倍以上の感度があると推定できた。得られたシグナルのパターンは通常の方法で得られた細顆粒状のものと同であった。また検出感度を比較する目的で BO4 モノクローナル抗体に直接 AT tail を付加した。その結果、2000x では Envision+では弱いシグナルしか得られなかったが、間接 Immuno-AT tailing 法ではより強く、直接法と間接法を組み合わせると十分なシグナルが

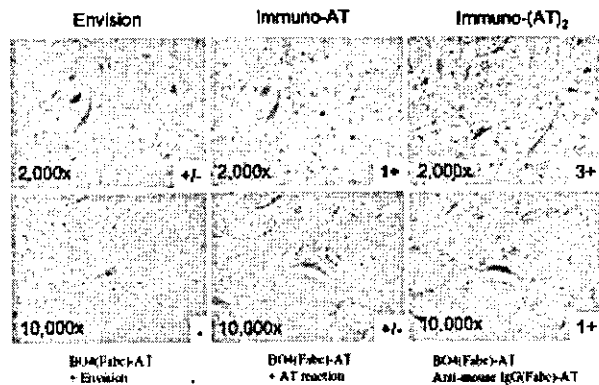
得られることがわかった(図5)。また標識1次抗体を10,000x希釈してもシグナルが得られた。抗体の標識の際に100倍希釈しているので、前者ではもとの抗体濃度から換算すると、およそ20万倍希釈でも十分なシグナルが得られたことになり、また後者では100万倍希釈と推定できる。したがって Immuno AT tailing 法で検出感度の増加があること、そしてその程度は4倍から100倍程度に感度上昇が得られるのではないかと考えられた。今後は標識抗体の濃度および標識効率等、詳細な検討を行う予定である。

(図4)

現行法(Envision法)との比較



(図5)



D. 考察

昨年度開発した迅速包埋迅速免疫組織化学法を1年間の確認検査で併用し、HE標本に与える影響およびBSEプリオンの免疫組織化学による検出の比較を行った。また確認検査では1時間程度の追加固定が行われ、実際の検索には必要十分とも考えているが、より固定時間を長くして一般に行われている脳組織の病理学的検索と比較する目的で検討した。その結果は、HE染色の形態像では軽度の空胞変性ないし海綿状変性でも検出でき、また免疫組織化学でも同程度のシグナルの強さでプリオンが検出できたため、実際にほぼ使えるものと評価できた。利点は反応時間が短い

ためか、非特異染色所見がほとんどみられなかった点である。現在まで確認検査のうち、ウェスタンブロット法と病理免疫組織化学が不一致の例は2例の若齢牛検体のみであり、他の例では一致している。したがって、若齢牛でプリオン蓄積量の少ない場合はいずれも方法でも検出は不可能であるが、他の例では免疫組織化学で検出できた他の例においては、結果に記載したような多少の不利益な点があるものの、ほぼ同様の検出結果であったことから、実際の確認検査でも使えるものと考えている。作業については反応時間が短いことから、たとえば作業者は朝9時から夕方4時まで休み時間がほとんどとれなくなる以外は問題ない。ただし、マイクロウェーブ機器の購入費がかかる。

免疫組織化学の高感度化については、これまでいろいろと試してみたがうまくいかなかった。今回の immuno AT tailing 法は抗体にヌクレオチドを標識して、この部分を増幅することで感度上昇結果が得られた。その増加程度は1次抗体の希釈倍率でのみ推定しているため、より詳細な検討が必要である。抗体への標識効率を調べることで、さらに標識効率を上げること、そして標識抗体を精製することで、さらに感度の増加が可能と考えられる。AT tail の増幅については以前にわれわれが in situ hybridization 法で応用し、検出感度の増加という結果を得たことがあるが、抗体に直接標識してホルマリン固定標本で検討した成績はない。Envision+法と比較すると、反応ステップ数が増えるので時間がかかり、迅速性では劣るが、検出感度増加が少なくとも2桁、あるいはそれ以上あげられれば、有用性は非常に高く、また汎用性も考えられる。いくつかの改良点も考えられるので、引き続き検討を行い、実用化に向けて研究を続けていきたいと考えている。

E. 結論

確認検査の病理・免疫組織化学検査において、受付した同じ日の夕方までに結果が出せるような迅速包埋・迅速免疫組織化学法を実際の検体で評価し、使用可能であることがわかった。また高感度 Immuno AT-tailing 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

- 1) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T.: Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2004 Dec 22; [Epub ahead of print]
- 2) 佐多徹太郎：牛海綿状脳症とその感染発病メカニズム. *食品衛生研究* 54: 17-22, 2004.

2. 学会発表

- 1) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Higuchi Y, Sato Y, Sata T and the expert committee for BSE diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.: Prion 2004: BSE inspection in Japan and finding of atypical PK-resistant Prion Protein(PrPres) in an apparently Jealth 23-month-old Holstein Steer. First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion. Paris, France May 24-25, 2004.
- 2) Yamamoto T, Hattori S, Ushiki Y, Yokoyama T, Tagawa Y, Tsukagoshi-Nagai H, Sata T, Yamakawa Y, Hall WW, Kinoshita N, and Irie S.: BSE screening kit with simplified preparation method for EIA sample. International symposium: Prion Diseases, Food and Drug Safety. Sendai, Japan, Oct. 31 - Nov. 2, 2004.
- 3) 土屋耕太郎、山河芳夫、佐多徹太郎、小野寺節、上田 進：牛プリオンタンパク質に対する新規抗体の作成と性状の解析。第52回日本ウイルス学会（横浜）2004.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

2. プリオン蛋白質の構造解析とプリオン感染の不活化

分担研究者 堀内 基広 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^{Sc}) の減少・消失とプリオン感染価の減少・消失が一致した挙動を示すことが知られている。しかし、様々なプリオン不活化法が全て、PrP^{Sc} の減少・消失を引き起こすかについては不明である。そこで高温高圧処理によるプリオン不活化に伴う PrP^{Sc} の変化、および液化エチレンオキシド (LEO) 処理によるプリオン不活化に伴う PrP^{Sc} 分子の変化について解析した。スクレイピー帯広株感染マウス脳を LEO で処理した場合、2.0%LEO 処理では、使用した全ての抗 PrP 抗体で PrP^{Sc} を検出することはできなかった。一方、低濃度 (0.7%) LEO 処理ではプリオン感染価は未処理の 2% にまで減少し、B103 抗体により検出される PrP^{Sc} は感染性の減衰と同じ割合で減少したが、mAb132、mAb31C6、および mAb43C5 により PrP^{Sc} を検出した場合は、PrP^{Sc} の減少は未処理対照と比較して最大でも 40% 程度であった。LEO は Lys、Met、Cys、Tyr、His 残基を修飾する。aa95-Lys は B103 のエピトープを構成する重要なアミノ酸残基であることから、0.7%LEO 処理により B103 抗体で検出される PrP^{Sc} が減少することは、aa95-Lys が LEO により修飾を受けた結果と考えられた。以上の結果は、PrP^{Sc} 分子の分解がおこらなくても、特定のアミノ酸の修飾がプリオンの不活化に関与することを示唆するものである。一方、熱処理の場合、90°C 処理では未処理と比較して PrP^{Sc} の量は変化せず、110°C 処理では未処理の 1/10 程度に減少し、130°C 以上の処理では検出限界以下となった。熱処理による PrP^{Sc} 分子の変化は検出に用いた抗体すべてで同様であった。従って、熱処理では PrP^{Sc} 分子の加水分解がプリオン不活化に関与すると考えられた。

A. 研究目的

プリオンの主要構成要素は PrP^{Sc} と考えられており、PrP^{Sc} 減少とプリオン感染価の減少は一致した挙動を示す。一方、PrP^{Sc} の特定のアミノ酸の修飾が、プリオン感染価に影響する可能性もある。プリオン不活化の機構に関する知見は、より確実なプリオン不活化法の策定に貢献すると思われる。また、医療行為によるプリオン感染の防止、肥飼料を介したプリオン感染の防止など、プリオン感染拡大の防止にも有用な知見を提供するものと考えられる。そこで、本研究では高温高圧処理によるプリオン感染価の変化と PrP^{Sc} の生化学性状の変化、液化エチレンオキシド (LEO) 処理による PrP^{Sc} の変化を種々のエピトープを認識する抗 PrP 抗体パネルを用いて調べ、プリオンの不活化に伴う PrP^{Sc} の変化に関して情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1%スクレイピー帯広株感染マウス脳乳剤に LEO を最終濃度、2%、0.7%、0.3%、および 0% になるように加え、室温で 40 時間反応させた。そ

の後、PBS に対して一晩透析後の試料をバイオアッセイおよび PrP^{Sc} の検出に用いた。透析後の試料を 40 µg/ml の PK で 30 分消化後、methanol:2-butanol (1:5) 混合液により PrP^{Sc} を沈殿させた。

高温高圧処理では 263K 株感染ハムスター脳を使用した。脳一個をガラスシャーレーに入れ、70°C、90°C、110°C (2 気圧)、130°C (3 気圧)、150°C (5 気圧)、170°C (7 気圧) で 30 分処理した。70 および 90°C 処理は蒸気釜、110 および 130°C 処理はオートクレーブ、150 および 170°C 処理は高圧蒸気装置で行なった。熱処理後、PBS にて 20%脳乳剤を作製した。

263K 株のバイオアッセイには Tg7 マウスを使用した。10%脳乳剤を 20 µl 脳内接種した。20%脳乳剤と detergent buffer を等量混合し、コラゲナーゼ処理した後に、40 µg/100mg 組織の PK で 30 分、37°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、methanol:2-butanol (1:5) 混合液により PrP^{Sc} を沈殿させた。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学大学院獣医学研究科動物実験委員会、および帯広畜産大学動物実験委員

会にて承認された実験指針に従って行なった。感染性を含む試料は北海道大学大学院獣医学研究科 BSL2 および 3 実験施設、帯広畜産大学 BSL2 および 3 実験施設にて行なった。

C. 研究結果

表 1 に実験に用いた抗体が認識するエピトープを示した。B103 ポリクローナル抗体および mAb31C6 はエピトープを構成するアミノ酸が同定されている。2%LEO 処理した試料からは、使用した抗 PrP 抗体パネルで PrP^{Sc} は検出されなかった (図 1)。しかし、0.3%および 0.7%処理では、抗体により PrP^{Sc} の検出に差が認められた。B103 で PrP^{Sc} を検出した場合、0.3%LEO 処理で未処理の場合の 48 %に、0.7%LEO 処理では 0.8 %に減少した。一方、0.7%LEO 処理後に、mAb132、mAb31C6、mAb43C5、mAb147 で検出される PrP^{Sc} (高分子のものも含む) はそれぞれ未処理の 108 %、32 %、60 %、および 28 %であった。モノマーとして電気泳動で分離できた PrP^{Sc} のみを定量化した場合でも、0.7%LEO 処理後に mAb31C6 で検出される PrP^{Sc} は未処理の 42 %であった。この結果から、0.7%LEO 処理では、未処理の脳乳剤中に存在する PrP^{Sc} の 40%程度の PrP^{Sc} が分解されずに存在することが明らかとなった。

プリオン感染価は 0.3%LEO 処理で約 70%、0.7%LEO 処理で約 98 %低下する。プリオン感染性の減少と B103 により検出される PrP^{Sc} は量的に同様の変化を示した (図 2)。

263K 株の高温高圧処理による不活化を検討したところ、130°C (3 気圧)、30 分処理では、バイオアッセイに使用した Tg7 マウスの 7 匹中 3 匹が、平均 182 日で病末期に至った。150°C 以上の処理では、バイオアッセイに用いたマウスは発病しなかった (表 2)。PrP^{Sc} の検出に関しては、使用した抗体全て、量的および質的に同様の変化を示した。90°C 処理までは未処理と差がなく、110°C 処理では未処理の 1/10 程度まで減少し、130°C 以上の処理後では PrP^{Sc} を検出することはできなかった。(図 3)。

D. 考 察

LEO は Lys, Cys, Met, Tyr, His のアミノ酸残基を修飾することが知られている (品川ら、未発表)。aa95-Lys は B103 のエピトープを構成する主要なアミノ酸残基である。一方、mAb31C6 のエピトープは LEO により修飾を受けるアミノ酸を含んで

いない。従って、0.3~0.7%LEO 処理で B103 による PrP^{Sc} 検出の低下は PrP^{Sc} の分解によるものではなく、LEO 処理により B103 のエピトープが修飾を受けた結果と考えられる。また、同処理によるプリオン感染価の減少と、B103 により検出される PrP^{Sc} の減少が量的に一致した。この結果は、B103 のエピトープが修飾されることとプリオンの不活化が直接関連することを示すものではないが、0.3~0.7%LEO 処理では、PrP^{Sc} の特定のアミノ酸が修飾を受けることも、プリオン感染価の減少につながることを示すものと考えられる。

E. 結 論

0.7%LEO 処理ではプリオン感染価は未処理の 2 %まで減少し、B103 抗体により検出される PrP^{Sc} は量的に感染性の減衰と同じ割合で減少した。一方、mAb31C6 で PrP^{Sc} を検出した場合は、PrP^{Sc} の減少は未処理対照と比較して最大でも 60 %程度であった。従って、PrP^{Sc} 分子の分解のみならず、特定のアミノ酸の修飾もプリオンの不活化に関与すると考えられた。一方、熱処理による PrP^{Sc} 分子の変化は検出に用いた抗体すべてで同様であった。従って、熱処理では PrP^{Sc} 分子の加水分解がプリオン不活化に関与すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim C-L, 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* 320:41-52, 2004.
- 2) Kim C-L, Karino A, Ishiguro N, Shinagawa M, Horiuchi M: Cell surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol* 85:3473-3482, 2004.
- 3) Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M: Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J Vet Med Sci* 66(10):1293-1295, 2004.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Horiuchi, M. Inhibition of protease-resistant

prion protein (PrP) formation by anti-PrP antibodies, The 7th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, The 6th COE International Symposium for Zoonosis Control (2004, 7/8, Sapporo)

- 2) Horiuchi, M., Tamura, Y., and Furuoka, H. Comparative analyses of three mouse-adapted scrapie strains G1, Obihiro, and I3/I5 and pathogenesis of G1 strain-induced polyuria in ICR mice. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (2004, 10/31-11/2, Sendai, Japan)
- 3) Horiuchi, M., Kim, C.-L., Ogino, M., Furuoka, H., and Shinagawa, M. Cell surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (2004, 10/31-11/2, Sendai, Japan)
- 4) Horiuchi, M. BSE screening in Japan, The animal prion disease and USE (2004, 10/14-16, Ames, USA)

国内学会

- 1) 金チャンラン、堀内 基広：抗 PrP 抗体による培養細胞レベルでの PrP^{Sc} 産生抑制機構の解析. 第 52 回日本ウイルス学会（横浜）2004.11.21-23.
- 2) 山口 聡子、宮澤 孝幸、堀内 基広：人工合成硫酸化糖アナログによる PrP^{Sc} 産生抑制. 第 52 回日本ウイルス学会（横浜）2004.11.21-23.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 使用した抗体とエピトープ

抗体	エピトープ
B103	aa89-107: QGGTHGQWNKPSKPKTNMK
mAb 3F4	aa106-115: KTNMKHMAGA
mAb132	aa119-127: AVVGGLGGY
mAb31C6	aa143-149: DWEDRY
mAb43C5	aa163-169: RPVDQYS
mAb147	aa219-229: KESQAYYDGR

*斜体 (赤字) はファージディスプレイ法により決定した
エピトープに必須なアミノ酸

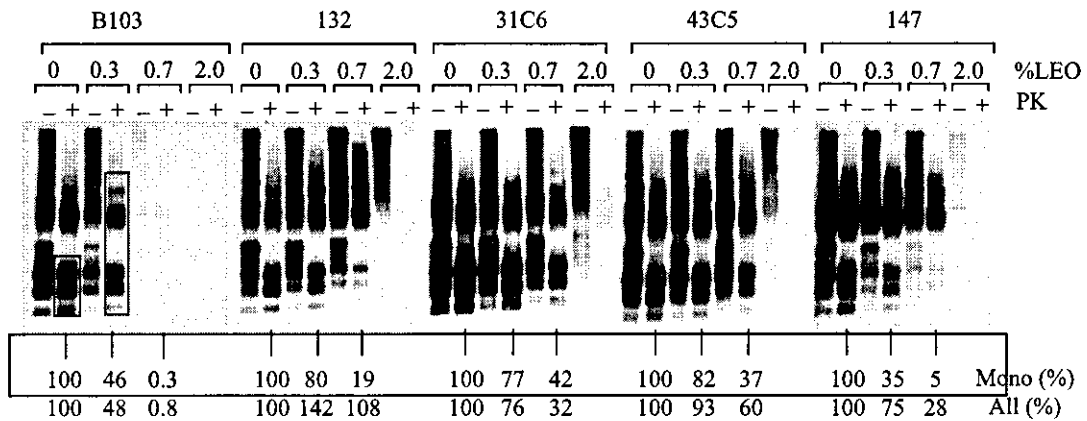


図1 LEO処理後脳乳剤からのPrP^{Sc}の検出

下の数字は各々の抗体におけるLEO未処理PrP^{Sc}(PK+)を100%とした時の
相対値(%)を示す。上段はモノマーのPrP^{Sc}のみを定量した結果(Mono)、下段
は高分子PrP^{Sc}までを含めて定量した結果(All)を示す。定量解析に用いたバ
ンドをB103のパネル内に示した。

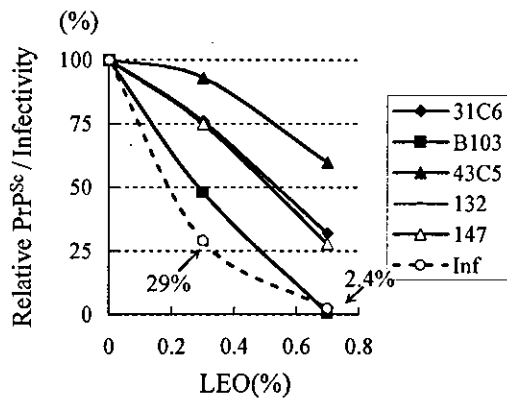


図2 LEO処理に伴う感染価とPrP^{Sc}の減少

高分子のPrP^{Sc}を含めて定量した相対値 (図1
の下段) をプロットした。バイオアッセイの結果から得られた感染価の減少(Inf)も合わせてプ
ロットした。0.3%および0.7%LEO処理した時の
感染価の相対値を図中に示した。

表2 高温高压処理による263K株の不活化

処理温度	潜伏期(日) (発症数/接種数)
170	>365 (0/7)
150	>365 (0/7)
130	182±47 (3/7), >365 (4/7)
110	NT
90	41±0 (6/6)
70	NT
未処理	47±3 (4/4)

脳一個を高温高压処理後に、10%脳乳剤を作製し、Tg7マウスでバイオアッセイを行った。

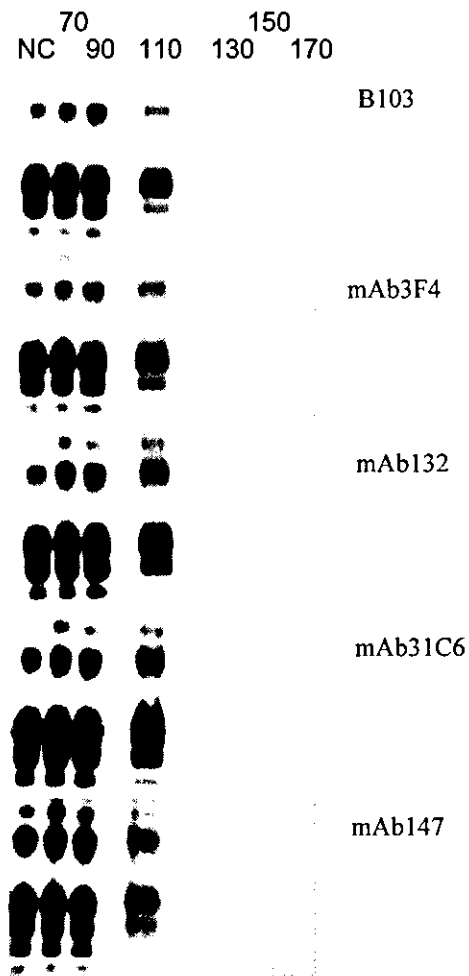


図3 高温高压処理に伴うPrP^{Sc}の減少
未処理(NC)から90°C処理までは、0.25mg脳相当を、110°C処理は2.5mg脳相当を、130°C以上の処理では5mg脳相当を泳動し、左に示す抗体でPrP^{Sc}を検出した。