

200501021A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成17年度食品の安心・安全確保推進研究事業
「食品を介するBSEリスクの解明等に関する研究」班
班員名簿

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
松田潤一郎	独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部	研究リーダー
萩原 健一	国立感染症研究所・細胞化学部	主任研究官
金城 政孝	北海道大学電子科学研究所・超分子分光分野	助教授
岡田 洋之	動物衛生研究所プリオン病研究センター・病態解明研究チーム	チーム長
村山 裕一	動物衛生研究所プリオン病研究センター・安全性技術開発研究チーム	チーム長
横山 隆	動物衛生研究所プリオン病研究センター・病原・感染研究チーム	チーム長
古岡 秀文	国立大学法人帯広畜産大学・病態獣医学講座	助教授
石黒 直隆	岐阜大学応用生物科学部・獣医学課程・食品環境衛生学教室	教授
寺尾 恵治	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	センター長
扇 勉	北海道立畜産試験場・畜産工学部・生産病予防	部長
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科・プリオン病学教室	教授
山河 芳夫	国立感染症研究所・細胞化学部第1室	室長
大西 和夫	国立感染症研究所・免疫部	主任研究官
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
金子 清俊	東京医科大学医学部・生理学第二講座	主任教授
鈴木 達夫	東京都芝浦食肉衛生検査所	所長

目 次

I. 食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

総括研究報告書（平成 17 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）

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・高感度病理診断法の開発—・・・・・・ 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. 新規トランスジェニックマウス製作による異常プリオンバイオアッセイ系の開発・・・・ 13

分担研究者：松田 潤一郎（独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部）

3. 蛍光・発光法を用いる選択性に優れた高感度分析法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

分担研究者：萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）

4. 蛍光相関分光法によるプリオン蛋白の超高感度蛋白検出法の開発・・・・・・・・・・・・ 19

分担研究者：金城 政孝（北海道大学電子科学研究所・超分子分光分野）

5. 新しい方法を用いた病理検査技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

分担研究者：岡田 洋之（動物衛生研究所プリオン病研究センター・病態解明研究チーム）

6. 最新の診断及び検査技術に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27

分担研究者：村山 裕一（動物衛生研究所プリオン病研究センター・安全性技術開発研究チーム）

7. 牛海綿状脳症(BSE)プリオンの生物学的性状と「種の壁」のメカニズム解明・・・・・・ 31

分担研究者：横山 隆（動物衛生研究所プリオン病研究センター・病原・感染研究チーム）

8. BSE 感染動物における感染・発症機構の解明—国内発生 BSE のマウスへの伝達—・・・・ 35

分担研究者：古岡 秀文（国立大学法人帯広畜産大学・病態獣医学講座）

9. プリオン感染に対する宿主応答と体内伝播	39
分担研究者：石黒 直隆（岐阜大学応用生物科学部・獣医学課程・食品環境衛生学教室）	
10. 霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究	45
分担研究者：寺尾 恵治（独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）	
11. BSE 脳内感染実験牛のプリオン体内分布	49
分担研究者：扇 勉（北海道立畜産試験場・畜産工学部）	
12. プリオンの標的細胞特異性決定機構とプリオン蛋白質の細胞内分解に関する研究	53
分担研究者：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）	
13. プロテオーム解析によるプリオン病のマーカー分子の検索と同定 —PrP 結合タンパクの検索—	57
分担研究者：山河 芳夫（国立感染症研究所・細胞化学部）	
14. 異常プリオンの免疫系における増殖・伝播機構の研究	61
分担研究者：大西 和夫（国立感染症研究所・免疫部）	
15. BSE リスク解明を目的としたプリオン蛋白質構造変換改変による構造変換機序 解析に関する研究	67
分担研究者：堂浦 克美（東北大学大学院医学系研究科）	
16. プリオン蛋白質の立体構造変換因子に関する研究	71
分担研究者：金子 清俊（東京医科大学医学部・生理学第二講座）	
17. 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	77
分担研究者：鈴木 達夫（東京都芝浦食肉衛生検査所）	

I. 総括研究報告書

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究要旨 食品を介した BSE の人への健康影響レベルについては不明な点が少なくないので、異常プリオンタンパク質の高感度検査法を検討し診断技術に役立てるとともに、BSE 感染牛由来材料を用いた in vitro および in vivo での感染発症機構を検討し、さらに牛由来の特定部位の除去および廃棄方法等、およびめん羊等へのサーベイランスに関する研究を行うことにより、食品を介する BSE リスクの解明に関する研究を行う。本年度は、全工程 6 時間以内で終了する新しい病理・免疫組織化学法を確立し、PET プロット法の改良が進んだ。小型全自動蛍光相関法測定装置で ELISA と同等の感度を確認した。PMCA 法によって BSE プリオンの増殖が非特異凝集体の形成によって阻害されることが判明した。BSE プリオンのハムスターへの伝達性を規定するアミノ酸配列を明らかにした。わが国で摘発された BSE 例でマウス伝達試験が行えた例は、非定型および若齢型 BSE 以外では伝達が成功し、研究資源化が進んだ。ウシ由来マクロファージがプリオンを取り込み 12 日後までに分解することを明らかにした。PrP 結合タンパク質を質量分析法で解析し細胞内タンパク質が同定できた。発症したウシ型 Tg マウスの脾臓由来の B220+/CD21+細胞群にプリオンが陽性となった。ウエスタンブロット法に Unfoldin を使うことでプリオンの検出感度を上昇させることができた。BSE プリオンの脳内接種ウシは 12 ヶ月でプリオンの沈着を認め、20 ヶ月で発症し、臨床症状の確認とともに生前診断法開発を目的とした研究資源化が進んだ。枝肉処理方法や部位による汚染状況を考慮した方法を実施することで、脳脊髄組織汚染を防御できた。代替法として試行したパルス電気による不動化法は導入に問題はないと考えられた。舌扁桃の分布を明らかにし、舌扁桃の除去は粘膜固有層を除去することで可能であることを検証した。

分担研究者：

松田潤一郎（独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部 研究リーダー）

萩原健一（国立感染症研究所細胞化学部 主任研究官）

金城政孝（北海道大学電子科学研究所超分子分光分野 助教授）

岡田洋之（動物衛生研究所プリオン病研究センター病態解明研究チーム チーム長）

村山裕一（動物衛生研究所プリオン病研究センター安全性技術開発研究チーム チーム長）

横山 隆（動物衛生研究所プリオン病研究センター病原感染研究チーム チーム長）

古岡秀文（国立大学法人帯広畜産大学病態獣医学 助教授）

石黒直隆（岐阜大学応用生物科学部獣医学課程食品環境衛生学 教授）

寺尾恵治（独立行政法人医薬基盤研究所霊長類

医科学研究センター センター長）

扇 勉（北海道立畜産試験場畜産工学部 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 教授）

山河芳夫（国立感染症研究所細胞化学部 室長）

大西和夫（国立感染症研究所免疫部 主任研究官）

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）

金子清俊（東京医科大学医学部生理学 教授）

鈴木達夫（東京都芝浦食肉衛生検査所 所長）

A. 研究目的

牛海綿状脳症(BSE)は、1985年に英国で発生して以来、ヨーロッパ諸国、日本やカナダそして米国での発生が報告され、現在、世界で24ヶ国で19万頭弱が報告されている。わが国では2001年9月に日本初のBSE罹患牛の発見後、いわゆる全頭検査が導入された。2006年2月

までの約4.5年間で屠畜された約500万頭以上について検査された結果、15頭が摘発された。この中には21ヶ月の若齢牛や23ヶ月の非定型例の発見があった。また死亡牛検査で計7頭のBSE例がみつき、国内では計22頭となった。BSE牛から経口感染したと考えられる変異型クロイツフェルドヤコブ病(vCJD)例は、2005年2月に本邦第一例が報告され、全世界で英国160例、フランス18例、ほか11例の計189例となった。最近では輸血や血液製剤による人から人への感染例も報告され、さらに非発症例ではあるがプリオン遺伝子のコドン129のMV型にもBSEプリオン沈着がみつかった。このことから、予想以上の人への感染が危惧され、わが国でも「食の安全」問題として国民の大きな関心がBSEに寄せられている。しかしながら、食品を介したBSEの人への健康影響レベルについては不明な点が少なくなく、食品安全対策を検討するうえで困難を来している。そこで、異常プリオンタンパク質(プリオン)の高感度検査法の開発を行うとともに、わが国のBSE感染牛由来材料を用いた感染実験による感染・発症機構の検討を行うことにより、食品を介するBSEリスクの解明について研究を行い、厚生労働行政における食品安全対策に役に立つことを目的とする。

本研究の柱は4点であり、1)最新のBSE診断および検査技術に関する研究、2)BSEリスクの解明に関する研究、3)牛由来の特定部位の除去および廃棄方法に関する研究、そして4)めん羊等へのサーベイランスに関する研究である。

1) 最新のBSE診断および検査技術に関する研究: 全頭検査で非定型例や若齢例など病理・免疫組織化学的に診断しえない例があり、また特定危険部位以外でのプリオンの存在を調べるため、免疫組織化学の高感度化(佐多)およびPETプロット法(岡田)を応用する。スクリーニング検査には現在ELISA法が使われ、偽陽性例は陽性例の約10倍ある。現行法を補完し低い偽陽性率の検査法の確立を目的として時間分解蛍光・発光法(萩原)、蛍光相関法(金城)、そしてin vitroでのプリオン増殖系(村山)を応用する。また感染性判定のために新たに神経特異的発現トランスジェニックマ

ウスを用いるバイオアッセイ系の開発を行う(松田)。これらのBSE診断の迅速化と高度化によりBSEリスク評価に資する。

2) BSEリスクの解明に関する研究: a) in vivoで、小動物を用いたプリオンの生物学的性状と「種の壁」機構(横山)、BSE感染動物での感染・発症機構と研究資源化(古岡)、宿主応答と体内伝播機構(石黒)、免疫系における増殖・伝播機構(大西)、BSE脳内接種牛でのプリオン体内分布(扇)、霊長類モデルでの解析(寺尾)を行うことにより、感染プリオンの体内分布機構そして発症機構の解明をめざす。b) in vitroで、プリオンのプロテオーム解析(山河)、細胞特異性と細胞内分解機構(堀内)、立体構造変換機序(金子)、立体構造変換因子の探索(堂浦)について研究を行い、感染・発症機構の基礎データを得る。これらにより食肉のBSEリスクの解明をめざす。

3) 牛由来の特定部位の除去および廃棄方法に関する研究: 牛のとさつ解体工程における交差汚染防止を目的とし、枝肉等への汚染した脳・脊髄組織を確実に除去できる方法、また特定部位を含んだ排水による環境汚染を防止する方法、およびこれらの評価系を構築する(鈴木)。交差汚染状況および防止法を明らかにする。

4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究: 自治体からの検査依頼に対しウエスタンブロット法によりスクレイパー検査を行ってきた。この方法はBSEに対しても有効だが、適切なサーベイランス方法を決定しかつわが国の食用に供するめん羊等におけるBSE感染のリスク評価に役立てる(堀内、横山)。

B. 研究方法

1) 最新のBSE診断および検査技術に関する研究: BSE確認検査で得られた材料を用いて病理・免疫組織化学・PETプロット、蛍光法、in vitro増殖系、トランスジェニックマウス開発と解析を、技術基盤の構築と精度・感度の検討し改良する。BSE確認検査で判明したBSE陽性牛を積極的に調べる。

2) BSEリスクの解明に関する研究: a) in vivo; この実験は時間を要するので、伝達実験、動物の解析、プリオンの性状解析を継続し、「種の壁」機構の解明と進め、同時に研究資源化し

分担研究者等の研究に役立てていく。マウス、ヒツジ、ヤギ等の腸管ループを用いたプリオンの取り込みについて、FDC と神経系との関係について検索を進める。実験感染マウスの免疫担当細胞の分画精製とプリオン発現解析の結果、細胞移入系を作成し、プリオン維持細胞培養系実験系の開発と解析を進めていく。ウシやサルへの伝達実験では研究期間中に発症する可能性が高いので、髄液や血液、各組織の解析を経時的に行う。またバイオハザード型MR I コイル付き密封コンテナの開発を行う。研究資源化するとともに、ウシやサルでの継代株を確保し、さらに継代実験を進める。b) *in vitro* ; これらの検体を用いてタンパク質の高次分離系を作成し網羅的解析を行い、候補とされたタンパク質に対する特異抗体を作成し、ウエスタンブロット法などを試み、実用化の可能性を探る。プリオン感受性細胞、非感受性細胞への吸着と侵入実験ののち、細胞分化と代謝抑制でのプリオン分解酵素を同定し、プリオン分解に関与する酵素群の種々の発現系での微小環境を検討する。プリオンタンパク質の構造変換阻害物質の解析を繰り返し、プリオン持続感染細胞で解析を進展させる。

3) 牛由来の特定部位の除去および廃棄方法に関する研究 : と畜場で解体されるウシや用具、食肉、そしてと畜場の排水における GFAP 量で交差汚染について調査検討し、それとともに新たな評価系を開発し、と畜解体法や排水処理法を検討する。

4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究 : 食肉衛生検査所で可能となるスクリーニング検査法の選定および確認検査法の確立により、研修資料の作成、そして実用性を検討する。(倫理面への配慮)

動物実験には各施設の動物実験委員会等に申請し承認を受けてから、動物倫理と福祉に配慮して行う。またバイオセーフティについても各施設の該当委員会に申請し許可を受け、適切な施設において適切な方法で実験を行う。

C. 研究結果

1) 最新の BSE 診断および検査技術に関する研究 : マイクロウェーブを用いる迅速包埋法、および NaOH 前処理による免疫染色法を組み

合わせることにより、さらに 1 時間短縮が可能となり、全工程が 6 時間以内で病理・免疫組織化学法による結果が得られるようになった。また高感度化を目的とした新しい免疫組織化学検出法の開発のメドがついた(佐多)。PET ブロット法はホルマリン固定後にギ酸処理を行うと反応が消失した。オートクレーブ処理および NaOH 処理では抗体を 3 種類混ぜて使うことにより反応が得られるようになった(岡田)。組換えウシプリオンタンパク質について蛍光相関分光法、および蛍光相互相関分光法の検出感度を明らかにし、小型全自動蛍光相関法測定装置で ELISA と同等の感度を確認した(金城)。異常型プリオンタンパク質に由来するペプチド断片を可溶系で測定する方法の開発を行った。マイクロビーズにペプチドを捕捉した検出系を作成しマイクロ流路分析系で実用的感度が得られた(萩原)。超音波を用いたプリオンの *in vitro* 増殖法である *protein-misfolding cyclic amplification (PMCA)* 法の最適化を行った。ハムスタープリオンと比較し BSE プリオンの増殖効率はかなり低い原因が非特異凝集体の形成にあることが判明した(村山)。マウスプリオン蛋白質のプロモーター活性のある領域をクローニングした。上皮細胞よりも高いプロモーター活性を神経細胞由来の N2a 細胞で確認した。現在このプロモーターを用いて TG マウスを作出している(松田)。

2) BSE リスクの解明に関する研究 : BSE プリオンのハムスターへの伝達性を規定するアミノ酸配列を明らかにした。また TgBoPrP の伝達試験により PrP のアミノ酸配列以外の要因の関与も「種の壁」に関係すると考えられた。わが国の非定型 BSE および若齢型 BSE の伝達試験は継続中である(横山)。国内 BSE6 頭のマウスへの伝達試験では 470 日から 800 日の潜伏期間であった。BSE のマウス伝達実験の 2 継代で潜伏期間が著明に短縮し、さらに研究資源化を進めている。3 種類のマウスでの感受性と免疫組織化学では諸外国の報告と一致した。I/LnJ マウスでは星状グリアの陽性像や C57BL の小脳分子層のプラーク像が新たに認められた(古岡)。腸管に取り込まれた PrP^{Sc} の複製を調べるため、牛由来マクロファージ細胞株に *in vitro* でスクレイピープリオンを添加した。

その結果、プリオンを取り込み 12 日後までに分解することを明らかにした(石黒)。プリオン感受性および非感受性細胞を比較し、プリオン非感受性細胞から高発現する 18 遺伝子を同定し、siRNA によりノックダウンした状態でプリオンを感染させたのち PrPSc の産生について検討したが、8 クローンでは陰性であった(堀内)。プリオンタンパク質の機能解析としてタグをつけたプリオンタンパク質を N2a 細胞に発現させ、PrP 結合タンパク質を質量分析で同定した。Neurabin2, debrin, peripherin 等の細胞内タンパク質が同定できた。また PrPC は N2a 細胞の樹状突起や細胞間結合部位にアクチンと共局在していた(山河)。免疫担当細胞群におけるプリオンの発現と分布、体内伝播に関与する細胞の同定、そして免疫担当細胞による *in vitro* モデルシステムを確立することを目的とし、ウシプリオン発現遺伝子改変マウスに BSE プリオンを脳内接種し、発症マウスの脾臓細胞を分画した。B220+/CD21+の細胞群(B細胞、マクロファージ、FDC)にプリオンが認められた。この B 細胞群からハイブリドーマを作製したが、1 ヶ月間しかプリオンを保持しなかった。BILL カドヘリン遺伝子欠損マウスに Obihiro1 株を脳内ないし経口接種したところ、脳や脾臓にもプリオンが検出され、有意な延命効果が観察された(大西)。プリオンの複製増殖に関与する補助因子の同定を目的と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ところ、3 次スクリーニングで 8 遺伝子まで絞り込んだ(堂浦)。新規に同定した分子シャペロンである Unfoldin は生体内凝集体を解きほぐす機能をもつので、ピック小体で検討したところ、抗体による検出能を 1000 倍以上改善した。BSE 脳を用いた検討によりウエスタンブロット法での感度が大幅に上昇した(金子)。脳内接種ウシで 12 ヶ月後に中脳、橋、網膜等でプリオンを検出した。20 ヶ月で臨床症状が認められた(扇)。BSE プリオン接種後のサルは、接種後 28 ヶ月を経過した時点で行動異常、脳波異常が認められ、また脳内接種群では成長遅延がみられた(寺尾)。

3) 牛由来の特定部位の除去および廃棄方法に関する研究: 脳・脊髄組織による枝肉等の汚染

防止対策の構築を目的にグリア繊維性酸性タンパク(GFAP)を用いた枝肉汚染状況の把握と汚染除去方法の検討及びピッシングに替わる不動化法の検討を行った。さらに舌扁桃に関する調査を実施した。枝肉処理方法や部位による汚染状況を考慮した方法を実施することで、脳脊髄組織汚染を防御できた。代替法として試行した電気による不動化はピッシングよりやや強度が劣るが、と畜場の設備やと畜方法を工夫して使用すれば、導入に問題はないと考えられた。分布しないとされていた最終有郭乳頭から舌尖部方向にも舌扁桃の存在が確認された。また舌扁桃の除去は粘膜固有層を除去することで可能であることを検証した。

4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究: ウエスタンブロット法および ELISA 法を作成した。

D. 考 察

1) 最新の BSE 診断および検査技術に関する研究: 従来の迅速検出法におけるプリオンの前処理法を改良することにより、検出感度を損なわず時間の短縮が可能となり、1 日の working time 内で確認検査が十分行えるようになった。この方法は現在世界で最速である。PET ブロット法はおおまかなプリオンの組織内存在と局在がわかる感度の高い方法であるが、実用化にはその工程をさらに検討する必要がある。蛍光相関法では現在の ELISA 法よりもさらに感度を上げる工夫が必要である。新たにプリオンの可溶性系での蛍光検出系を考案し実験を行い、今後の見通しを立てることができた。次年度以降の成果を期待したい。PMCA 法は期待されているプリオン増殖検出法でハムスタープリオンでは成果が報告されている。しかし、BSE では効率が悪く実際的ではなかった。今回その原因が明らかにされたことから、選択的に凝集体形成を阻止する方法の開発が必須である。前年度作製した CAG プロモーターを用いた遺伝子組換えマウスはプリオンタンパク質の発現量と病期短縮に直接関連がみられなかったため、あらたなプロモーターを用いた組換えマウスを作製する。今回神経細胞により特異的なプロモーターが得られたので、その調節因子群を明らかにするとともに、BSE プリオン遺伝子

組換えマウスを作製中である。

2) BSE リスクの解明に関する研究 : BSE プリオンはハムスターへの伝達性は認められていない。マウスとハムスターのキメラ PrP を発現する Tg マウスでの伝達試験により、PrP131-188 のアミノ酸配列が伝達性に関与することが明らかとなった。BSE 遺伝子改変マウス Tga20 の初代潜伏期間が長いことから、初代の感受性は PrP の過発現にはよらず、継代時には PrP の過発現で潜伏期が短縮されると考えられた。わが国の BSE プリオンのマウスへの伝達試験における潜伏期が長いのは、わが国の BSE 例がすべて臨床症状のない例であることに由来すると考えられる。BSE プリオンの生物学的性状は報告例と一致するが、新たな所見もみつけた。ウシマクロファージ細胞株は PrP^{Sc} を積極的に取り込み分解することから、腸管から取り込まれた PrP^{Sc} はリンパ系組織のマクロファージで処理されると考えられた。プリオンの増殖や分解に係わる遺伝子を同定することは現在ではできていない。プリオンの感受性には複数の遺伝子が係わることが考えられる。細胞膜表面に存在する PrP^C と結合する細胞内タンパク質が同定され、PrP^C が細胞内情報伝達に関与する可能性が考えられた。B 細胞ハイブリドーマにはプリオンを長期保持する因子が欠損していると考えられた。BILL カドヘリン分子がプリオンの発症に関与している可能性が考えられた。今回同定した異常型プリオンタンパク質の発現に影響を与える遺伝子産物はどの細胞にも発現するものであり解析を進めていく。異常凝集蛋白質の抗原抗体反応による検出感度の改善に Unfoldin が利用できる可能性を示した。BSE プリオンを接種したサルに臨床所見の異常がみられたので、早期確定診断の目的で MRI 検査や生検を予定している。

3) 牛由来の特定部位の除去および廃棄方法に関する研究 : GFAP の残留は胸腔内側および内側前肢においても見られたので、背割りによる二次的な汚染があると考えられた。洗浄効果は改善策を実施しても残留する可能性があることがわかった。手動高圧洗浄を追加すること、および背割り面の脊髄周辺の汚染をスチームバキュームで除去することで洗浄効果を上げら

れる。また洗浄方向はある程度の高さから下方へ、また水圧は汚染を拡散させない程度がよく、洗浄時間の延長が必要であった。背割り位置を正中からずらす方法は非常に高度で精密な作業であり、実際 GFAP が検出された例もあることから、作業員の技術の研鑽と適切な洗浄が必要となる。背割りのこぎりの洗浄は現在でも十分洗浄されていると考えられるが、飛散状況から考えてフェイスガード等の防護対策が必要であろう。舌扁桃は最終有郭乳頭より舌尖部方向にもあったが、粘膜固有層を完全に取り除くと舌扁桃は認められなかったので、筋肉を露出すれば完全に除去することが可能である。パルサー装置を用いた不動化にはスタンニングの影響が大きいので、導入にはと畜工程全般について検討する必要がある。

4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究 : 検査方法としてほぼ完成したので、今後は実際の例についての検討を進めることができる。

E. 結 論

全工程 6 時間以内で終了する新しい病理・免疫組織化学法を確立し、PET プロット法の改良が進んだ。小型全自動蛍光相関法測定装置で ELISA と同等の感度を確認した。PMCA 法によって BSE プリオンの増殖は非特異凝集体の形成によって阻害されることが判明した。BSE プリオンのハムスターへの伝達性を規定するアミノ酸配列を明らかにした。わが国で摘発された BSE 例で、マウス伝達試験が行えた例は非定型および若齢型 BSE 以外では伝達が成功し、研究資源化が進んだ。ウシ由来マクロファージがプリオンを取り込み 12 日後までに分解することを明らかにした。PrP 結合タンパク質を質量分析で同定し細胞内タンパク質が同定できた。発症したウシ型 Tg マウスの脾臓由来の B220+/CD21+細胞群にプリオンが陽性となった。ウエスタンプロット法に Unfoldin を使うことでプリオンの検出感度を上昇させることができた。BSE プリオンの脳内接種ウシは 12 ヶ月でプリオンの沈着を認め、20 ヶ月で発症した。枝肉処理方法や部位による汚染状況を考慮した方法を実施することで、脳脊髄組織汚染を防御できた。代替法として試行した電気に

よる不動化は導入に問題はないと考えられた。
舌扁桃の分布を明らかにし、舌扁桃の除去は粘
膜固有層を除去することで可能であることを
検証した。

F. 健康危険情報
とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担研究者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

金城政孝：

発明の名称: 蛍光相関分光法又は蛍光相互相
関分光法を用いた抗原の迅速検出法

特許出願番号：特願 2005-264394。

発明者：斎藤健太、坂田啓司、藤井文彦、金
城政孝、田村 守

2. 実用新案登録

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・高感度病理診断法の開発—

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、飛梅 実（感染研・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 昨年度評価できた迅速包埋・迅速免疫組織化学法に NaOH 前処理法を取り入れることで、全工程 6 時間の迅速検査法を完成した。NaOH 前処理法では C 末側の抗原決定基を認識する抗体で良好な結果が得られ、N 末側の抗原決定基を認識する抗体では反応性が低下ないし消失した。また、免疫組織化学の高感度化を目的に immuno-AT tailing 法の改良を行った。抗体へのオリゴ dA-dT 標識法を確立したが、未標識抗体の除去には問題が残った。反応条件を改良できたので、高感度化をはかるため、さらに詳細な実験条件の検討を続けている。

A. 研究目的

BSE 確認検査マニュアルにある病理・免疫組織化学法では、通常、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、種々の観点から実際には 1 日以内に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、現在のウエスタンブロット法と同じ 1 日以内で終了可能となる方法について検討してきた。その結果、より迅速な病理検査法を開発し、さらにその有効性検討し、昨年度にほぼ完成した。この方法でも前処理法として使用している hydrolytic autoclaving に約 1 時間程度かかっていたが、本年過マンガン酸カリと NaOH を用いる方法が報告され、より短時間で処理が終了する可能性が考えられたため、その応用を検討した。

一方、非定型例や若齢牛の検体はウエ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。昨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が、いまだ不十分であるため、諸条件の改良を試みた。

B. 研究方法

1) ウシ延髄組織

昨年度の検討に用いたウシ延髄組織を用いた。内訳は同様に、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。また BSE 確認検査の残りの材料のうち、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。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

16 年度に報告した方法で、マイクロウエーブ包埋装置を用いて包埋した。

3) 前処理法および免疫組織化学法

この包埋装置での抗原賦活化法として 110°C 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 B103 や T4 ペプチドウサギ抗体およびマウスモノク

ローナル抗体パネルを用いた。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。一部の例では CSA 法を用いた。

前処理法として過マンガン酸カリウムとチオ硫酸ナトリウム処理、その後に NaOH 処理を行うのが原法（Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 53:1199-1202, 2005）であるが、追試と改良を試みた。

4) 高感度免疫組織化学法（Immuno-AT tailing 法）

基本的には昨年度報告した方法と同じである。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。感度の比較対照として現在用いている Envision+ 法を使った。本年度は標識抗体の作製、標識抗体の精製、反応条件の検討を行い、上記の染色法でその効果を比較した。

（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。

C. 研究結果

1) パラフィン切片の前処理法

免疫染色には抗体を T4、検出には Envision+ と DAB を行った。通常の BSE 確認検査に用いた検体では、原法通りの過マンガン酸カリウム

処理、チオ硫酸ナトリウムでの中和、そして NaOH 処理を行うと切片の破壊が起り、良好な免疫染色結果を得ることは出来なかった。ただ、十分に固定された検体では弱いながらも陽性のシグナルが得られた。そこで、過マンガン酸カリウム処理とチオ硫酸ナトリウム処理を省き、75 mM NaOH 処理を 55-60°C で 10 分間行ったら、良好な染色結果が得られた（図 1）。室温では良好な結果は得られなかった。10 分間の処理ですむので、以前は hydrolytic autoclaving 全体で 45 分程度かかっていたのに対し約 1 時間の短縮が可能となった。したがって全工程が 6 時間となった（図 2）。

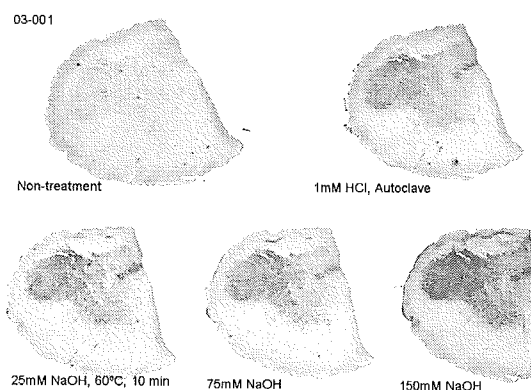


図 1

現行法と迅速包埋-前処理-MW法の比較

ホルマリン固定-ギ酸処理	
パラフィン包埋: 計 4.5時間 ・脱水(エタノール)7段階130分 ・置換(キシレン): 3 60分 ・包埋(パラフィン): 4 40分	パラフィン包埋: 計 2.4時間 ・脱水(エタノール)4 step 85分 ・置換(キシレン): 1 10分 ・包埋(パラフィン): 1 33分
薄切+乾燥+HE染色	
前処理: 計 1時間 ・オートクレーブ, 121°C 20分	前処理: 計 0.2時間 ・NaOH処理 60°C 10分
免疫染色: 計 3-4時間 ・ブロック: 5分 ・1次抗体反応: 45分 ・二次抗体: 30分 ・発色、核染、封入	免疫染色: 計 1時間 ・ブロック: 5分 ・1次抗体反応: 10分 ・二次抗体: 10分 ・発色、核染、封入
計 1.5日(12時間)	計 1.0日(6時間)

図 2

NaOH 処理の濃度を 25 mM から 1 M まで変化させて至適濃度を求めた。その結果、25 mM で、従来行ってきた hydrolytic autoclaving 法の結果よりもシグナルが強くなり（図 3）、400 mM までは切片が剥離せずにシグナルを得たが、やや弱くなる結果を得た。BSE 陽性例でさらに検討を加えると、およそ 100 mM までは強くな

るがそれ以上では弱くなる傾向を認めたため、至適濃度として 100 mM と決定した (図 4)。hydrolytic autoclaving 法の結果と比較すると、シグナル強度は高くなり、染色パターンは同じで背景の染色が低下した。抗体の希釈倍率にはほぼ変化がないが、背景が低下するため 1 管程度は濃度を高くすることが可能と考えられた。

また、スクレイピー株感染マウスでは 25 mM で十分でそれ以上では切片が剥離してしまった。ヒト CJD 例でも 100 mM でシグナルの増強効果が確認できた。

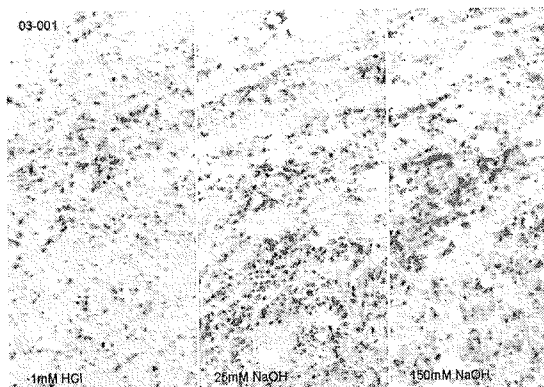


図3

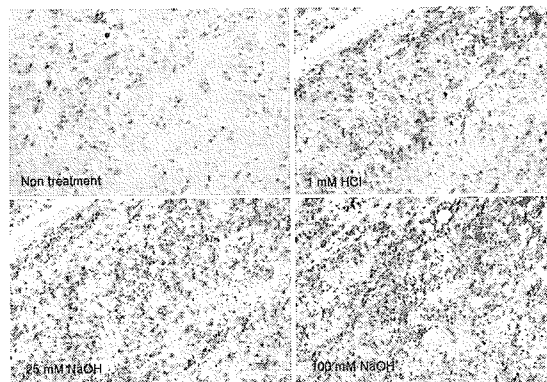


図4

2) プリオン抗体パネルでの検討 (図 5)

BSE 確認検査としての病理・免疫組織化学法では、通常 T4 ウサギ抗体を用いているが、B103 抗体や 44B1 抗体も使用することがある。ほか、hydrolytic autoclaving 法による前処理を行ったパラフィン切片で使用可能な抗体は、110, 2G11, Bo4, 118, 149, 1D12, 6H4, 43C5 などがある。これらの抗体を用いて、前述した MW 迅速包埋法、NaOH 前処理法、MW 迅速免疫組織化学法により、BSE プリオンのシグナルを検出した。その結果、ウシプリオン遺伝子のア

ミノ酸 140-150 前後を境に N 末側の抗原決定基を認識する抗体の反応性は低下ないし消失し、C 末側の抗原決定基を認識する抗体は反応性が保たれていた。もっとも良好な反応は C 末端近傍の抗原決定基を認識する T4 抗体であった。

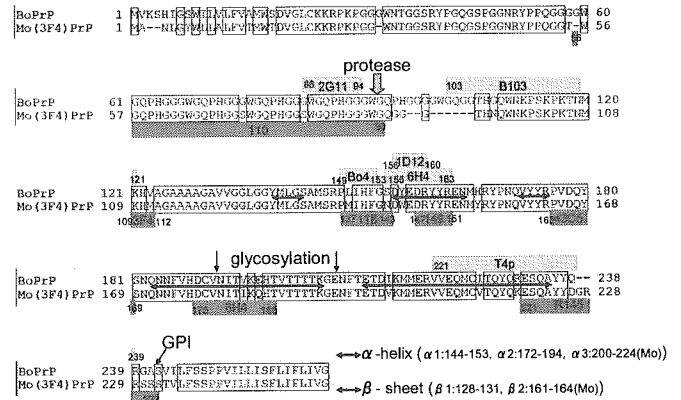


図5

3) 高感度免疫組織化学法 (Immuno-AT tailing 法)

昨年度、この方法を開発する価値があることが判明したので、標識方法を確立し、標識効率を上昇させること、さらに AT 伸長反応の効率をあげることで、そして検出感度増加法を工夫していくことが課題であった。抗体のオリゴ AT 標識法として、オリゴヌクレオチドを活性化し、還元した抗体の SH 基を結合させる方法がもっとも効率が良いことが判明した。また、標識抗体の精製法として、2 次抗体がウサギ抗マウス IgG 抗体の場合、マウス IgG を固相化したアフィニティークラムを用いてフリーの AT を除いて精製した。1 次抗体を直接標識する場合は HPLC によりフリーの AT を除去した。しかしながら、HPLC により標識抗体と未標識抗体をわけて回収することにはいまだ成功していない。AT 伸長反応の温度を 37°C から 42°C に上昇させることにより、検出感度が明らかに上昇した。システムの確立に向けて課題を少しずつ克服していくことがさらに必要である。

D. 考 察

一昨年度開発し、昨年度実際の検体で評価することができた迅速包埋・迅速免疫組織化学法は、従来 1 日半の工程を必要としていたのに対

し、7時間で終了するプロトコールである。しかし、今回プリオン免疫組織化学に hydrolytic autoclaving 法の代わりに 100 mM NaOH で 10 分間行い、T4 抗体による検出では全工程を 6 時間で終了できる。実際、昨年用いた検体で評価してみると、シグナルはかえって強く明瞭となった。したがって、すべての工程を短縮し、かつ検出は同程度以上となり、ここにほぼ完成させることができた。この方法については従来法とともに、平行して実績を積んでいる。

従来から用いている T4 抗体のみならず、他の抗体でも使えるかどうかを調べたところ、プリオン蛋白のアミノ酸 140-150 前後の抗原決定基を認識する抗体で反応性が異なることが副次的に判明した。プリオン蛋白質は C 末側で凝集していることが知られているがその詳細については不明なままである。今回の NaOH 処理法によるプリオンタンパク質の加水分解力は、プリオンの不活化に用いていることから推察できるように、hydrolytic autoclaving 法よりも強力と考えられる。すると、N 末側では NaOH により分解されやすい構造をとっている可能性が考えられる。ホルマリン固定組織切片での結果なので、その生理的状態を反映しているかどうかは不明であるが、実験が可能であれば、より詳細な解析を進めたいと考える。

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検出感度が上昇した。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、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。本年度にこれらの課題に取り組み、標識法については成果を得たが、標識抗体を未標識抗体からわけて回収するための HPLC 精製については、AT の分子量等の差異が少ないために、うまくいっていない。検出感度上昇のためには重要なステップなので検討を続けていく。また AT 伸長反応の効率化は DNA ポリメラーゼの反応温度を上げることで成果を得たが、現在、さらに液相で dig-dUTP の取り込み効率の高い酵素を試している。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。

E. 結論

確認検査の病理・免疫組織化学検査法として計 6 時間で終了する方法を確立した。また高感度 Immuno AT-tailing 法の改良を行った。

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 Neuropathology (Berl)*, 109:263-271, 2005.
- 2) Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T: Distribution of PrPSc in Cattle with Bovine Spongiform Encephalopathy Slaughtered at Abattoirs in Japan. *JJID* 2006. (in press)
- 3) 岩田奈織子、佐多徹太郎: BSE と変異型 CJD. ネオエスカ「感染症・アレルギーと生体防御」同文書院 2005, pp269-274.
- 4) 岩田奈織子、佐多徹太郎: BSE (牛海綿状脳症) と vCJD (変異型クロイツフェルト・ヤコブ病). *遺伝* 59: 63-69, 2005.

2. 学会発表

- 1) 中島典子、花木賢一、樋口好美、佐多徹太郎: 新しい免疫組織化学によるウシ脳切片からの BSE プリオンの検出. 第 94 回日本病理学会総会 (横浜) 2005 年 4 月
- 2) 岩田奈織子、佐藤由子、樋口好美、飛梅 実、永田典代、長谷川秀樹、中村優子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎: 国内 BSE 牛 3 例の体内プリオン分布. 2005 プリオン研究会 (天童) 2005 年 8 月
- 3) 岩田奈織子、佐藤由子、樋口好美、永田典代、長谷川秀樹、中村優子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎: 国内で確認された BSE 牛 3 例の脳および全身臓器における異常型プリオンタンパク質 (PrPSc) の分布. 第 53 回日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月

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. 新規トランスジェニックマウス製作による異常プリオンバイオアッセイ系の開発

分担研究者 松田 潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部

研究協力者 山河芳夫 (感染研・細胞化学部)、佐多徹太郎 (感染研・感染病理部)
飛梅 実 (感染研・感染病理部)

研究要旨 これまでに作製したマウスプリオンノックアウト・ウシプリオントランスジェニックマウス (以下ウシ型プリオン TG マウス) への BSE 牛由来脳乳剤接種実験の解析では、接種後早期に脾臓等に異常型プリオンの蓄積が認められた。生体内での異常プリオンの生成、蓄積を早期に検出することは可能になったが、プリオン病発症の指標となる神経症状発現の期間短縮には至らなかった。このウシ型プリオン TG マウスのプリオンタンパクの発現には CAG プロモーターを用いて誘導している。このため、プリオン蛋白質の発現量は高レベルを維持している。しかし、神経症状発症の期間短縮に至らなかったことから、発現量と病期短縮に直線的な関係を描ききれない可能性がある。従って、本研究ではマウス生体内でプリオン発現を調整しているプリオンプロモーター領域をクローニングし、ウシ型プリオン TG マウスのプリオン発現を誘導するプロモーターとして用いることを目的とした。その結果、プロモーター活性が認められるマウスプリオンのエクソン 1 領域を含む上流 5.5 kb がクローニングできた。この領域を含む場合、上皮細胞由来細胞株よりも神経細胞由来細胞株で高いプロモーター活性が得られた。エクソン 1 を含み、この領域よりも短い場合では、神経細胞、上皮細胞で共に高いプロモーター活性を有することから、神経細胞特異的な調節因子の作用部位が 5.5 kb 領域に保存されていることが推察される。今後、神経細胞特異的な調節因子群を明らかにすると同時に、この領域を用いてウシ型プリオン TG マウスを作製する。

A. 研究目的

本邦で屠畜されたウシの延髄門部は、採取後食肉衛生検査所で ELISA 法によるスクリーニング検査が行われる。異常型プリオンの検出はこの ELISA 法でのスクリーニング、ウエスタンブロットでの確認検査共にタンパク分解酵素であるプロテイナーゼ K (PK) を用いて、正常型プリオンを消化し、PK 耐性である異常型を検出している。PK 耐性という性質は異常型の一つの特徴であるが、病原性とパラレルであるとの報告はない。異常型の病原性を調べるための感染実験ではマウス等小動物が一般に用いられるが、迅速には判定できない。また、プリオン病の伝染には種の壁が存在することが報告されており BSE 由来組織の病原性を評価するためにはウシ型プリオン発現トランスジェニックマウスの存在が不可欠である。これ

までに我々はニワトリのアクチンプロモーターである CAG を用いてマウスプリオンノックアウト・ウシプリオントランスジェニックマウスを作製してきた。CAG プロモーターは、目的の蛋白質発現を極めて強く誘導することができる。作成された TG マウスの各種臓器ではウシ型プリオン蛋白質の高発現が認められ、BSE 由来脳乳剤接種マウスでは早期より脾臓での異常型プリオンの蓄積が認められた。しかし、神経症状発症の期間短縮に至らず、プリオンタンパク質の発現量と神経症状の発症までの時間に相関はなかった。そこで本研究では、正常固体のプリオン蛋白質発現パターンを持つマウスプリオンノックアウト・ウシプリオントランスジェニックマウスの作製を目的として、マウス生体内でプリオン発現を誘導しているプロモーター領域のクローニングを試みた。

B. 研究方法

1) プロモーター領域を解析、クローニングするため、C57BL/6J マウス脾臓よりゲノムを抽出した。マウス第2染色体のプリオン遺伝子及び、上流のプロモーター領域をコードしていると考えられる部位をPCRを用いて増幅した。プライマーの設計はマウスゲノムプロジェクトにより公開されている遺伝子配列を参考にした。

2) マウスプリオン・エクソン1を含む上流域5.5kbをクローニングし、pGL3-Luc (ウミシイタケルシフェラーゼ) ベクターに組み込んだ。また同時に、エクソン1を含まないもの、エクソン1を含む上流域2.9、1.0、0.5 kbのものも作製し、同様にpGL3-Lucベクターに組み込んだ。

3) クローニングされた領域のプロモーター活性を調べるため、クローニングされた領域を組み込んだpGL3-Lucおよび、コントロールとしてのpGL4-luc2 (ホタルルシフェラーゼ発現ベクター) をヒト腎臓細胞株293F細胞、マウス繊維芽細胞株NIH3T3、マウス神経細胞株N2aにコトランスフェクションし、48時間後にルミノカウンターでルシフェラーゼの発光を測定した。

C. 研究結果、考察

エクソン1を含む領域では293F、NIH3T3、N2a細胞においてプロモーター活性を認めた。この活性はエクソン1領域を欠如することで認められなくなった。また、エクソン1を含む上流域0.5 kb、1.0 kbでは5.5 kb領域を含むものに比べてプロモーター活性は低かった(図1)。NIH3T3、N2a細胞を用いた実験では、エクソン1を含む上流2.9 kbでもプロモーター活性は認められたが、NIH3T3では5.5 kbのものよりも強く誘導された。この2.9 kbの領域はN2a細胞では5.5 kbの領域よりもプロモーター活性が弱く、5.5 kbの領域に神経細胞特異的な転写因子結合部位が存在することが示唆された(図2)。

D. 結論

CAGプロモーターを用いたウシ型プリオン発現TGマウスでは、プリオン蛋白質発現量と神経症状発症時間に相関が無かったことから、神経細胞特異的にプロモーター活性を有するエクソン1領域を含む上流5.5 kbを新規に作成するウシ型プリオンTGマウスのプロモーターとして用いることとした。

E. 健康危険情報

とくに無し。

F. 研究発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

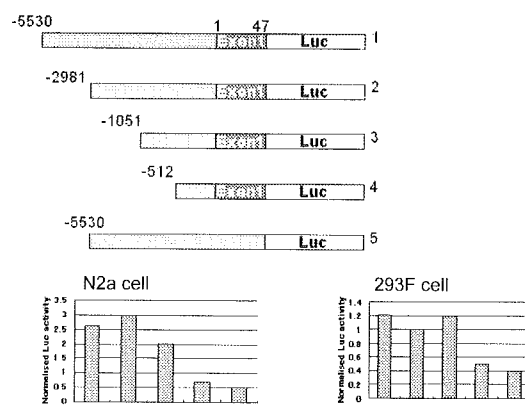


図1. マウスPrionプロモーター領域検索 (pGL-3 basicを用いたルシフェラーゼ assay)

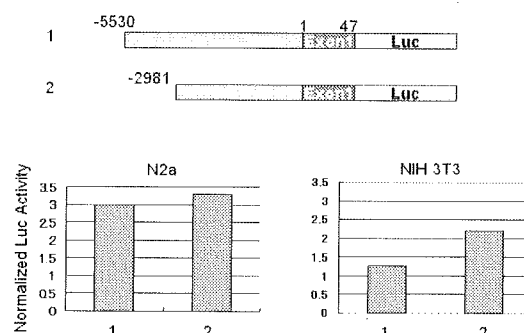


図2. N2aおよびNIH 3T3細胞でのプロモーター活性

3. 蛍光・発光法を用いる選択性に優れた高感度分析法の開発

分担研究者 萩原 健一 国立感染症研究所細胞化学部

研究要旨 現行の BSE スクリーニング検査において汎用されているサンドイッチ ELISA は、可溶性の生体分子（ホルモンなど）を対象とした既存の ELISA 法の方法論を踏襲している。しかしアミロイド様の凝集体である異常型プリオン蛋白質を測定対象とする場合、不溶性試料ゆえの測定系の不均一性やアミロイド様凝集体ゆえに適切な抗原部位の露出が困難であるという問題点が存在する。一次スクリーニングの疑陽性率の低減と陽性検体に対する高感度化には、これらの問題点の克服が重要であると考へ、異常型プリオン蛋白質に由来するペプチド断片を均一系（可溶性系）において測定する方法論の考案・開発に着手した。初期検討の結果、検出対象である異常型プリオン蛋白質のプロテイナーゼ K 抵抗性の消化断片について、そのシステイン残基（ハーフシスチン）の側鎖チオール基を利用して固相に共有結合を介して固定後、適切な抗プリオン抗体を用いて検出を行なう方法論の有用性が期待できると考えられた。しかし同時に、幾つかの難点も明らかとなり、今後はこれらの難点の克服も含めてさらに詳細な条件検討が必要である。

A. 研究目的

わが国の屠畜場における BSE 全頭検査は、屠畜後のウシから危険部位（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、食肉衛生検査所において主として BioRad 社製、Platelia BSE Purification Kit を用いたサンドイッチ ELISA 法によるスクリーニング検査が行われている。サンドイッチ ELISA は、測定対象が可溶性の生体分子（ホルモンなど）である場合には、analyte はプレート上の固相化抗体に一般に効率良く捕捉され、捕捉された analyte は検出用抗体によって高い選択性で高感度に検出できる。しかしアミロイド様の凝集体である異常型プリオン蛋白質の場合、測定対象が不溶・不均一であり、さらに、アミロイド様凝集体のために抗原部位が十分に露出し難いという問題点がある。スクリーニングにおいて微量の異常型プリオン蛋白質を含む検体を見逃さずに陽性/疑陽性と判定し確認検査へ送付するためには、スクリーニング検査における陽性・陰性の判定閾値を可及的に低く設定する必要があることは言うまでもない。現行スクリーニングでは充分量の異常型プリオン蛋白質を蓄積した検体に対しては判定上の難点は全く無い。しかし、微量の異常型プリオン蛋白質を含む検体をも見逃さずに陽性/疑陽性

と判定すべく、Platelia の場合には、その判定閾値を「真に陰性」検体の ELISA 値（陰性バックグラウンド値）が含まれるほどの低値に設定している。実際、2001 年 11 月以来に国立感染症研究所が Western blotting 法による確認検査のために受領した検体において、非常に低い ELISA 値を与える 2 頭の BSE 例を逃さずに捕らえることができているが、その一方で、100 例以上の「真に陰性」検体が偽陽性として確認検査に回されている。効率の良い BSE 全頭検査の実施には、選択性の高いスクリーニングによる疑陽性率の低減が望まれ、また、S/N 比を改善した高い選択性は高感度化にとっても極めて重要である。以上の理由から、変性操作により抗原エピトープを露出させた異常型プリオン蛋白質に由来するペプチドを共有結合を介して固相に固定化することによって、現行スクリーニング検査を将来的に相補できるような、選択性に優れ高感度な分析法の開発を目指した。

B. 研究方法

1) 異常型プリオン蛋白質

初年度の研究においては、マウス神経芽腫 neuro2a (N2a) 細胞に対してスクレーパーを持続感染させることにより得た ScN2a 細胞が産