

生する異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) を PrP<sup>Sc</sup> 標品として用いた。すなわち、細胞に 1% Zwittergent 3-14/0.2% sodium deoxycholate/130 mM NaCl/25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)を加えてピペッティングによりライセートを得て、このライセートを 1500 xg、4°C、5 min 遠心して得られる上清 (およそ 1 mg 総蛋白質/ml) を proteinase K (10 µg/mg 総蛋白質)により 37°C、60 min 酵素消化した。酵素消化反応を 2 mM PMSF (最終濃度)を添加して停止させ、100,000 xg、4°C、60 min 遠心して得られる沈渣に 30 µL の 1% SDS/100mM tris (2-carboxyethyl) phosphine-HCl/0.2 M boric acid-NaOH (pH8.5)を加えて、95°C、5 min 加熱し PrP<sup>Sc</sup> を変性・還元し、その後の検討に供した。

## 2) ミクロビーズ

蛍光性シリカビーズとして sicastar®-greenF (micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany)、ダミーの対照シリカビーズとして sicastar® (micromod Partikeltechnologie GmbH)を用いた。両者ともビーズ表面に修飾可能なアミノ基を有する径 12 µm の球状シリカ粒子であり、前者は λex 485 nm/λem 510 nm の緑色蛍光を発する。また、両者の比重は 1.8 g/ccm である (カタログ記載値)。一方、プロテイン G を固定化したビーズは、Dyna beads® protein G (DYNAL 社、Norway)を用いた。

3) PrP<sup>Sc</sup> のビーズ表面への固相化およびマイクロビーズ上の PrP<sup>Sc</sup> の検出

3-1) シリカビーズ: sicastar®-greenF ビーズを H<sub>2</sub>O、CH<sub>3</sub>CN、H<sub>2</sub>O の順に遠心操作により洗浄後、0.2 M boric acid-NaOH (pH8.5)/CH<sub>3</sub>CN にて 2 x 10<sup>7</sup> 粒子/ml となるようにに再懸濁した。これに、0.5 倍容量の 30 mM N-succinimidyl-6-maleinidohexanoate (EMCS、同仁化学) または、N-succinimidyl (4-iodoacetyl) aminobenzoate (SIAB、PIERCE) の DMSO 溶液を加え、室温にて 30 min 震盪することによりスクシイミド基とビーズ表面のアミノ基との反応によりビーズ表面を EMCS ないし SIAB により修飾した。反応後、修飾ビーズを 0.2 M boric acid-NaOH (pH8.5)/5 mM EDTA にて遠心洗浄して過剰の未反応の EMCS/SIAB を除去したあと、修飾蛍光性ビーズとの粒子数比が 1:1 となるように未修飾非蛍光性ビーズ (ダミー) の混合した。変性・還元した PrP<sup>Sc</sup> をリジルエンドペプチダーゼ消化 (37°C、60 min) 後、この蛍光性/非蛍光性ビーズ混合懸濁液 (約 5 x 10<sup>6</sup> 粒子/ml) を添加し、42°C、30 min 反応させた。反応後、L-cysteine (終濃度 1 mM) を加えて未反応のマレイミド基ないしヨードアセタミド基をブロックし、遠心洗浄 → 6H4 抗体 (Prionics) とのインキュベート・洗浄 → Alexa647 標識-抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) とインキュベート・洗浄、の順に操作

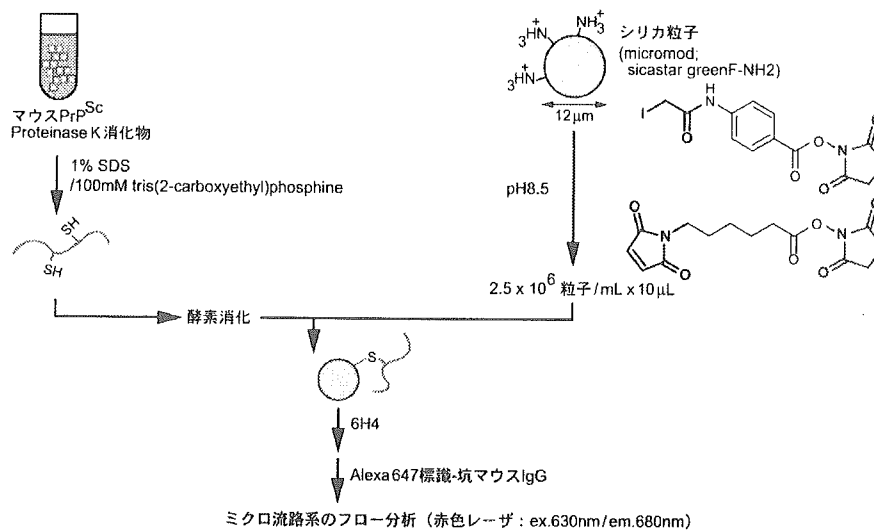


図1 方法-1のフローチャート

を行ない、10  $\mu$ l (最初の容量から換算して、約  $1 \times 10^6$  粒子/ml と期待される) を Agilent Technologies 社製のバイオアナライザ 2100 に同社製のセル・アッセイチップを装着したマイクロ流路分析機 (赤色蛍光検出 ex.630 nm/em.680 nm、緑色蛍光検出 ex.470 nm/em.525 nm) にかけた (図 1)。

3-2) プロテイン G ビーズ: 50 mM Tris-HCL/100 mM NaCl/0.5% Tween-20 (TBS-T) にて洗浄した Dyna beads® protein G ( $2 \times 10^7$  粒子、50  $\mu$ l) を 400 ng の 6H4 抗体とインキュベート後、未結合の抗体を (TBS-T) にて洗浄・除去した。一方、変性・還元した PrP<sup>Sc</sup> (1 容量) に対して、1 容量の 20 mM biotinyl-iodoacetamidyl-3,6-dioxaoctanediamine (PEO-iodoacetyl biotin、PIERCE) 水溶液を加え (終濃度 10 mM) 25°C、60 min 反応させた。反応後、1 容量の L-cysteine (終濃度 3mM) を加えて過剰のヨードアセタミド基をブロック後、7 容量の 50 mM Tris-HCL/100 mM NaCl を加えて、最初の変性・還元 PrP<sup>Sc</sup> 試料中の SDS/tris (2-carboxyethyl) phosphine 濃度を 1/10 に希釈した後、リジルエンドペプチダーゼ消化 (37°C、30 min) を行なった。酵素消化反応を PMSF 添加 (終濃度 5 mM) により停止させた後、6H4 抗体を結合した Dyna beads® protein G (終濃度約  $2 \times 10^7$  粒子

/ml) と混合・インキュベートした。系に残存する過剰量の未反応の PEO-iodoacetyl biotin を TBS-T にて洗浄・除去後、HRP 標識-ストレプトアビジン (Vector Laboratories) とインキュベートした。次いで、ビーズを TBS-T にて洗浄することにより過剰の HRP 標識-ストレプトアビジン除去し、洗浄後のビーズ上を ECL-plus (Pharmacia) および LAS-3000mini ルミノ・イメージアナライザー (富士写真フイルム株式会社製) を用いた化学発光検出にかけた (図 2)。

(倫理面への配慮)

今回はマウス培養細胞から調製した異常型プリオン蛋白質を、国立感染症研究所のバイオセーフティ規則に準じて用いた。倫理上の問題は無いと考える。

### C. 研究結果・考察

3-1) においては、緑色蛍光を有するマイクロビーズ表面をチオール反応性官能基 (マレイミドもしくはヨードアセタミド) を有する化合物によって修飾し、PrP<sup>Sc</sup> 由来のシステイン含有ペプチドをチオール基を介してマイクロビーズ (固相) 上に捕捉した検出系の構築を試みた。非蛍光性の未修飾ビーズをダミーとして添加しておくことで、マイクロ流路系にて 1 個 1 個のビーズ上の PrP<sup>Sc</sup> に由来すると思われるシグナルを

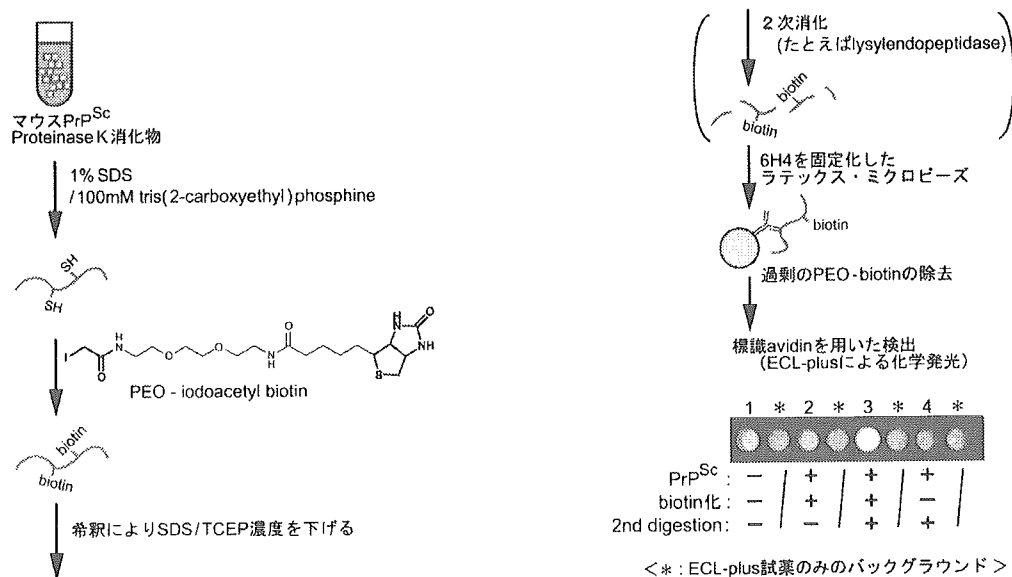


図2 方法-2のフローチャート

検出する際、非蛍光性ビーズ上にシグナルが検出された場合には、そのシグナルは PrP<sup>Sc</sup> に由来しない非選択的なシグナルとして排除できる、という偽陽性シグナルを低減するための工夫を行なった。しかし、ペプチドのシステイン残基と固相との反応効率が予想よりも低く、期待した感度を得るに至らなかった。システイン残基とチオール反応性官能基との反応が、‘固-液相の接触面’においてのみしか進行しないと考えられるが、操作条件である中性～弱アルカリ性下におけるシロキサン結合の分解によりシリカビーズの表面から反応性化合物が離脱してしまった可能性も考えられる。実際、実験操作後のビーズ粒子を光学顕微鏡により観察すると、ビーズの化学的・物理的破損によると思われる‘粒径の不均一性’が目立った。

一方、3-2)は、最初に液相反応系において蛋白質とチオール反応試薬とを反応させたあとに固相上に固定化するという系であり、今回の予備実験においては比較的良好な選択性と感度が期待できた。現行の Platelia 等では固相化した抗体を用いて（未変性の）PrP<sup>Sc</sup> 凝集体を捕捉していることと比較すると、方法—2)においては変性 PrP<sup>Sc</sup> 由来ペプチド断片を固相に捕捉させている点において、選択性・感度に関して有利であるかもしれない。しかし、ペプチドの固相上への捕捉は抗原-抗体反応に頼っており、本質的には既存の ELISA 法の延長にすぎない。この点において、抗原エピトープを露出させたペプチド断片を固相上に共有結合を介して固定する（Western blotting 法において、変性 PrP<sup>Sc</sup> が PVDF 膜上に主として疎水結合によってほぼ不可逆的に捕捉されているのに匹敵するように）方法の開発が肝要である。

#### D. 結論

PrP<sup>Sc</sup> を変性・還元アルキル化後に蛋白質分解酵素によって消化し、得られる可溶性ペプチドの化学的特性（アミノ酸即鎖の反応）と免疫化学的特性（抗体との反応）を利用して選択的に検出する測定系の確立を目指した。当初に発案した 3-1)は、本年度の検討においては期待した感度を得ることができなかった。一方、

3-2)においては、ペプチドの化学的特性を利用した方法論が可能であるという今後の見通しを立てることができた。今回の 3-2)においては、3-1)の発想（蛍光性マイクロビーズに非蛍光性ダミー・ビーズ添加しておくことで、選択的/非選択的シグナルを分別する）を踏襲し、また 3-1)との比較する目的から、マイクロビーズを用いたが、本年度の検討結果からはマイクロビーズの使用が必ずしも最適の系とは限らず、むしろスクリーニング法としての汎用性を考慮すると ELISA 方式のフォーマットも捨て難いと云う印象を受けた。引き続き検討を行って、問題点の克服を続けていきたいと考えている。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 萩原健一、山河芳夫：異常型プリオン蛋白質(PrPSc)と感染力. 医学のあゆみ 215 (11): 887-890, 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)

##### 2. 学会発表

- 1) Hagiwara K, Nakamura Y, Ouchi F, Nishijima M, and Yamakawa Y: Conversion of PrPC to PrPSc is prevented by inhibition of dehydrocholesterol reductases; the enzymes of the final steps in the cholesterol synthesis. 第 78 回日本生化学会大会（神戸）2005.10.

#### 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

## 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

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

研究協力者 藤井文彦 (リサーチレジデント)、堀内基広 (北大獣医プリオン病学)  
上野雅由、安住純一 (富士レビオ帯広研究所)

研究要旨 蛍光相関分光法 (FCS) を用いて、組換え牛プリオンタンパク質 (rBoPrP) の検出を試みた結果、緩衝液中での検出限界値は 0.44 nM であった。さらに、蛍光相関分光法 (FCS) よりも感度が高いとされる蛍光相互相関分光法を (FCCS) を用いて、組換え牛プリオンタンパク質 (rBoPrP) の検出を試みた。その結果、市販の FCCS 装置を用いた場合、緩衝液中での検出限界値は 0.24 nM、牛脳抽出液中での検出限界値は 0.29 nM であった。さらに、検査場への設置を念頭においた小型で安価な FCCS 装置の開発を行った。小型 FCCS 装置での検出限界値は、緩衝液中、牛脳抽出液中ともに 0.13 nM であった。今後は、罹患動物からの検出を試みる予定である。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) を含むプリオン病は、国際的な規模で拡大する人獣共通感染症である。したがって、検査法の開発は、世界的規模を念頭におくべきである。その場合、検査対象となる試料の数は膨大である。このような膨大な試料の検査には、現行の ELISA と同等以上の感度を有した、より迅速簡便な BSE 検査法が求められる。

蛍光相関分光法 (FCS) は、共焦点光学系を用いることにより、試料中の微小領域 ( $\sim 10^{-16}l$ ) の蛍光強度のゆらぎを計測する方法である。したがって、測定に要する試料体積は  $< \mu l$ 、測定濃度は  $< nM$  でよい。このゆらぎを相関関数を使って解析し、分子の数と大きさに関する情報を得ることが可能である。したがって、蛍光標識した抗 PrP 抗体の拡散速度を指標に、試料中の PrP の有無を判別できる。

一方、蛍光相互相関分光法 (FCCS) は、FCS をさらに発展させた計測法である。2種類の色素と2個の検出器を用いることにより、試料中の2種類の蛍光強度のゆらぎを計測する。解析は相互相関関数を使って行われ、2種類の信号の同時性を評価する。したがって、PrP を介して結合する2種類の抗 PrP 抗体の同時性を解析し、試料中の PrP の有無を判別できる。尚、FCCS では相互に相関

がある信号のみを解析するため、FCS よりも一桁感度が高いことが期待される。

加えて、FCS および FCCS は、分子に関する情報を分離精製を経ずに解析することが可能であるため、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。

そこで分担者は、これらの計測法を BSE 検査に適用することを目的とした。今回は、FCS および FCCS を用いて、緩衝溶液と牛脳抽出液中における、rBoPrP に対する検出限界値を報告する。また、試作した小型 FCCS 装置の感度も合わせて報告する。得られた検出限界値は、フレライザ BSE およびプラテリア BSE のそれと比較した。

### B. 研究方法

#### 1) 材料

rBoPrP と抗プリオン抗体 (72-5 と 44B1) は、富士レビオ帯広研究所から譲り受けた。

比較のための BSE 検出用 ELISA は、富士レビオ社製のフレライザ BSE とバイオラッド社製のプラテリア BSE を用いた。

#### 2) 牛脳抽出液の調製

牛脳抽出液は、フレライザ BSE を用いて牛延髄部から調製した。ただし、FCCS は蛍光測定であるため、フレライザ BSE 付属の色付き

検体希釈液を用いず、別途調製した。

また、牛脳抽出液中に存在する大きな戎雑物を除くため、3000×gで10分間の遠心操作を行った。尚、この操作でPrP<sup>Sc</sup>の量が減少しないことを、罹患したマウスを用いてELISAで確認している。

### 3) 抗体の蛍光標識

FCSでのrBoPrP検出用に、72-5から調製したFab'の蛍光標識を行った。標識には、Alexa Fluor-532 maleimide (インビトロジェン)を用いた。1Fab'あたりの色素数は、1.1個であった。

FCCSでのrBoPrP検出用に、72-5と44B1の蛍光標識を行った。標識には、それぞれAlexa Fluor-488 tetrafluoropheny esterとAlexa Fluor-647 succinimidyl ester (ともにインビトロジェン)を用いた。1抗体あたりの色素数は、それぞれ3.5と1.3個であった。

### 4) 測定機器

FCS測定には、MF-20 (オリンパス)を用いた。FCCS測定には、MF-20 (オリンパス)と小型FCCS (浜松ホトニクス)を用いた。

ELISAの吸光度測定には、GENios (テクカン)を用いた。

## C. 研究結果

### 1) FCSの検出限界値 (緩衝液中)

rBoPrPを用いて、緩衝液中でのFCSの検出限界値を決定した。検出には、72-5から調製したFab'-Alexa532(0.6 nM)と44B1(50 nM)を用いた。

60分間の反応時間の後、FCS測定を行った。検出の可否は、測定後に得られるパラメーターの1つ拡散時間を指標に決定した。ここで拡散時間とは、蛍光標識された物質が観察領域を通過するのに要する時間のことである。試料中にrBoPrPが存在する場合には、rBoPrPがFab'-Alexa532と44B1で複合体を形成し、拡散時間が大きくなる。一方、rBoPrPが存在しない場合には、Fab'-Alexa532の拡散時間が得られるのみである。

結果、緩衝液中でのrBoPrPの検出限界値は、FCS (MF-20、オリンパス)を用いた場合、 $0.44 \pm 0.13$  nMであった。

### 2) FCCSの検出限界値 (緩衝液中)

rBoPrPを用いて、緩衝液中でのFCCSの検出限界値を決定した。検出には、Alexa488とAlexa647でそれぞれ蛍光標識した72-5(0.1 nM)と44B1(0.09 nM)を用いた。

60分間の反応時間の後、FCCS測定を行った。検出の可否は、測定後に得られる相互相関関数の振幅を指標に決定した。ここで相互相関関数の振幅は、2色の蛍光標識された2つの物質が観察領域を同時に通過した場合に増加するパラメーターである。したがって、試料中にrBoPrPが存在する場合には、rBoPrPを介して72-5-Alexa532と44B1-Alexa647が複合体を形成し、観察領域を同時に通過する確率が増す。一方、rBoPrPが存在しない場合には、その確率が小さい。

結果、緩衝液中でのrBoPrPの検出限界値は、FCCS (MF-20、オリンパス)を用いた場合、 $0.24 \pm 0.10$  nMであった。

### 3) FCCSの検出限界値 (牛脳抽出液中)

rBoPrPを用いて、牛脳抽出液中でのFCCSの検出限界値を決定した。検出には、72-5-Alexa488(0.7 nM)と44B1-Alexa647(0.6 nM)を用いた。ここで用いた標識抗体の濃度は、緩衝液中で用いたそれよりも高い。これは、牛脳抽出液に由来する自家蛍光を上回る信号を得るためである。

結果、緩衝液中でのrBoPrPの検出限界値は、FCCS (MF-20、オリンパス)を用いた場合、 $0.29 \pm 0.11$  nMであった。

### 4) 小型FCCS装置の検出限界値 (緩衝液中および牛脳抽出液中)

rBoPrPを用いて、小型FCCS装置の検出限界値を決定した。緩衝液中では72-5-Alexa488(0.07 nM)と44B1-Alexa647(0.07 nM)を、牛脳抽出液中では72-5-Alexa488(0.09 nM)と44B1-Alexa647(0.11 nM)を用いた。

結果、緩衝液中と牛脳抽出液中でのrBoPrPの検出限界値は、小型FCCS (浜松ホトニクス)を用いた場合、ともに $0.13 \pm 0.03$  nMであった。

測定に要する時間と体積は、MF-20が3分と50 µlであったのに対し、小型FCCSは30秒と5 µlであった。

5) フレイザ BSE の検出限界値  
(緩衝液中および牛脳抽出液中)

rBoPrP を用いて、フレイザ BSE の検出限界値を決定した。検出の可否は、フレイザ BSE の定義に従った。

結果、緩衝液中と牛脳抽出液中での rBoPrP の検出限界値は、それぞれ 0.05 nM と 0.11 nM であった。

6) プラテリア BSE の検出限界値  
(緩衝液中および牛脳抽出液中)

rBoPrP を用いて、プラテリア BSE の検出限界値を決定した。検出の可否は、プラテリア BSE の定義に従った。

結果、緩衝液中と牛脳抽出液中での rBoPrP の検出限界値は、ともに 0.15 nM であった。

#### D. 考察

FCCS は FCS よりも約 2 倍感度が良いことが分かった。そこで、その後の牛脳抽出液中での検出等の検討は、FCCS を用いて行った。

牛脳抽出液は、自家蛍光を発しており、それが FCCS 測定に少なからず影響をあたえた。そこで、遠心操作と標識抗体の濃度を増やしたところ、改善がみられた。このことから、罹患動物からの検出も可能であろうことが示唆された。

緩衝液中でのフレイザ BSE の検出限界値は、FCCS およびプラテリア BSE よりも約 2 倍高かった。一方、牛脳抽出液中では、FCCS とフレイザ BSE およびプラテリア BSE の検出感度は、ほぼ同等であった。ここで特筆すべきことは、ELISA は酵素を用いて抗原に由来する信号を増幅しているにも関わらず、FCCS では抗原を含む複合体を直接検出していることである。したがって、FCCS に増幅過程を繰り込めば、大幅な感度の向上が期待される。

試作された小型 FCCS 装置は、市販の FCCS 装置と比較して感度が高かった。また、小型で安価に製造可能でことから、検査場への設置に適している。

#### E. 結論

FCS よりも FCCS の方が高感度であることが分かった。緩衝液中のみならず、牛脳抽出液

中でも rBoPrP の検出が可能であった。FCCS の検出感度は、BSE 検査用 ELISA と同等であった。今後はモデル感染動物(ラット)や実際の感染動物を利用してテストを行う予定である。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Jin T, Fujii F, Sakata H, Tamura M, Kinjo M: Amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene-coated CdSe-ZnS quantum dots for the optical detection of the neurotransmitter acetylcholine. Chem Commun 4300-4302, 2005.(Epub Jul 11)
- 2) Takahashi Y, Sawada R, Ishibashi K, Mikuni S, Kinjo M: Analysis of Cellular Functions by Multipoint Fluorescence Correlation Spectroscopy. Curr Pharm Biotech 6:159-156, 2005.
- 3) Jin T, Fujii F, Sakata H, Tamura M, Kinjo M: Calixarene-coated water-soluble CdSe/ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution. Chem Commun 2829-2831, 2005.(Epub Apr 21)

##### 2. 学会発表

- 1) Changi Pack, Kinjo M: Studying dynamics of tandem GFPs at nucleus in living cell by fluorescence correlation spectroscopy. Prague Post Genome Technology Workshop (PPGT). Prague, Czech Republic, June, 2005.
- 2) Kinjo M: Study of Protein Dynamics in Living Cell Using Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy. International Symposium on Molecular Nanotechnology. Nara, November, 2005.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 特許取得出願

発明者: 斎藤健太、坂田啓司、藤井文彦、金城政孝、田村 守

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

## 5. 新しい方法を用いた病理検査技術の開発

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

研究協力者 扇 勉、尾上貞雄、福田茂夫（北海道立畜産試験場）

研究要旨 ホルマリン固定後に蟻酸処理されたパラフィン包埋組織 (PET) を用いて、スクレピー感染マウス脳および本邦で発生した BSE 野外例に PET ブロット法が応用できるように、従来法よりも優れた抗原賦活化前処置を開発した。PET ブロット法はウエスタンブロット法と免疫組織化学的染色法の利点をかねそろえた高感度な異常プリオン検出法であることから、BSE 感染牛の不明な点、すなわち特定危険部位以外での異常プリオン検出に有効と思われるが、さらに詳細な反応条件の検討が必要である。

### A. 研究目的

ホルマリン固定したパラフィン包埋組織 (PET) を用いて、非定型例ならびに若齢例など海綿状変性がなく免疫組織化学的に異常プリオン蛋白が検出できない症例、ならびに特定危険部位以外でも異常プリオン蛋白を迅速かつ高感度に検出するため、PET ブロット法による BSE 診断への有用性について検討することで、BSE 診断の迅速化と高度化を計る。本年度は BSE 野外 15、17 例を用いて特定危険部位 (脳、脊髄、眼、扁桃、回腸遠位部) 以外で BSE プリオンが検出された末梢神経系、副腎のほか、全身所蔵器において免疫染色で陰性であった組織の PET ブロット法による検索を行う。

### B. 研究方法

スクレピー感染マウス脳および本邦で発生した BSE 野外例のホルマリン固定 PET 材料を用いて PET ブロット法を行った。BSE 脳についてはホルマリン固定後に 98%蟻酸に室温 1 時間浸漬して感染性を不活化し、スクレピー感染マウス脳については蟻酸処理と蟻酸未処理のものを用いた。

約 3  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、ニトロセルロース膜に塗布後十分に乾燥させ、脱パラフィンを行った。切片を載せた膜は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のプロテイナーゼ K 処理を 1 時間行った後、次の 3 種の方法で前処置した。1) 3M グアニジンチオシアン酸塩 (GdnSCN) 室温 10 分間処理、2) オートクレーブ (AC) 121°C 20 分

間処理、3) 120 mM 水酸化ナトリウム (NaOH) 室温 10 分間処理。それぞれの処理後、一次抗体には T1 (動衛研・田川作成)、T2、(動衛研・田川作成)、44B1 を用い、0.03~0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で室温、1 時間反応させた。二次抗体にはヒストファイン・シンプルステイン AP-M (ニチレイ) を 500 倍希釈して室温 30 分間反応させ、最後に NBT と BCIP で発色した。

### C. 研究結果

ホルマリン固定後に蟻酸処理を施していないスクレピー感染マウス脳では前処置法ならびに抗体の種類に関係なく免疫染色の結果に一致して陽性反応が出たが、ホルマリン固定後に蟻酸処理を施したスクレピー感染マウス脳および BSE 脳標本では GdnSCN 処理標本では反応が検出されなくなった (図 1)。一方、AC 処理および NaOH 処理標本では T1 抗体を使用

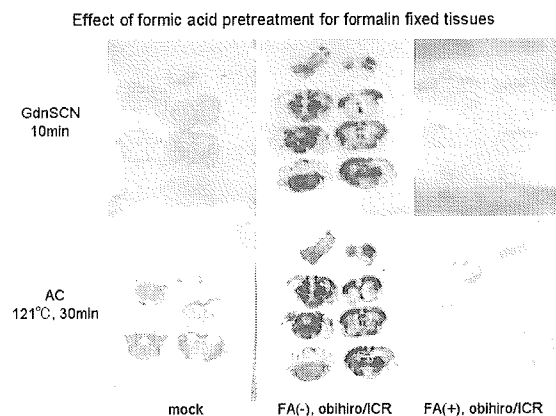


図 1. 蟻酸処理による PET ブロットへの影響

した場合にのみ陽性に反応がある場合があったが、その陽性シグナルは弱かった。そこで蟻酸処理を施したスクレピー感染マウス脳および BSE 脳標本に使用している 3 種類の一次抗体を混和してそれぞれの前処置法で検討したところ、GdnSCN 処理では反応を検出することは出来なかったが、AC 処理ならびに NaOH 処理法では蟻酸未処理標本のスクレピー感染マウス脳と同じ部位が陽性となり (図 2)、BSE 脳においても免疫染色で陽性になる部位に一致して陽性シグナルが検出された (図 3)。

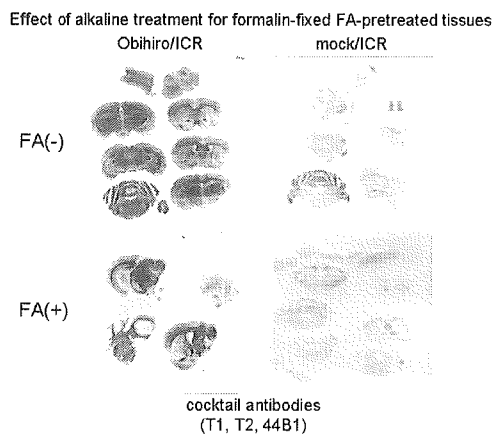


図 2. 水酸化ナトリウム処理法による改善効果

Alternative PET blot analysis of obex in 15th BSE case

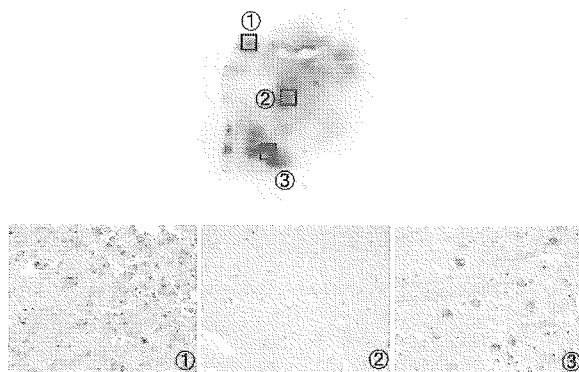


図 3. 国内 15 例目門部  
水酸化ナトリウム処理法での PET ブロット(上)と  
AC 処理法での免疫染色(下)

#### D. 考 察

プリオン病のホルマリン固定 PET に対する免疫染色には、化学的修飾、熱処理、酵素処理あるいはこれらの複合による抗原賦活化処理

が必須である。しかしプリオンの感染性を低減するための蟻酸処理は抗原性を著しく損なわせる。すでに報告されている PET ブロット法では、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病や BSE 脳の蟻酸処理 PET 材料で GdnSCN 処理法が行われているところから今回、蟻酸処理を施したスクレピー感染マウス脳および BSE 脳標本に適応してみたが良好な結果は得られなかった。そこで免疫染色で施されている AC 処理や最近開発された NaOH 処理法を PET ブロット法に応用したところ、T2 抗体や 44B1 抗体では良好な結果は得られなかったが、T1 抗体を用いた場合に十分ではないものの陽性シグナルが検出された。免疫染色においてしばしば複数の抗体を用いて良好な結果を出ることがあることから、さらにこの方法を応用して 3 種類の抗体を混和して使用したところ、良好な結果が得られた。確かに免疫染色では、AC 処理を施した切片に対して T1、T2、44B1 はほぼ同様に異常プリオンを染色するが、NaOH 処理を施した場合には T1 抗体では免疫染色の増強効果が得られるが、T2 ならびに 44B1 抗体では陽性反応の激減ないしは消失してしまうことから、AC 処理と NaOH 処理では抗原賦活化作用が異なると思われる。しかしながらその原因については不明である。

新たに開発した改良 PET ブロット法はウエスタンプロット法と免疫染色の利点を兼ね揃えた高感度な異常プリオンの検出法であることから、今後は使用する一次抗体の組み合わせと二次抗体の至適濃度についてさらに検討を加えて至適反応条件を決定させ、BSE 感染牛の病理発生における不明な点、すなわち特定危険部位以外における異常プリオンの沈着について解析していきたい。

#### E. 結 論

従来の GdnSCN 前処置法では蟻酸処理済みの PET に PET ブロットを施しても十分な結果が得られないことから、AC あるいは NaOH 処理を施した上で抗体を混和することにより、免疫染色より高感度に検出方法を開発できた。

#### F. 健康危険情報

とくになし。



G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 桜井 睦、星野めぐみ、入江亮子、後藤英雄、  
岡田洋之：プリオン病でのメタロチオネイ  
ンの影響. 2005 年プリオン研究会（天童）  
2005.11.

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

## 6. 最新の診断及び検査技術に関する研究

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

研究協力者 吉岡 都 (同・安全性技術開発研究チーム)、  
高田益宏、横山 隆 (同・病原・感染研究チーム)

研究要旨 潜伏期中の動物等から極微量の異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) を検出するには従来法の検出限界をはるかに凌ぐ超高感度な技法の開発が必要である。本研究では異常プリオンを試験管内で増幅させる PMCA 法の原理に基づき、全自動反応装置を用いて PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率、再現性、処理検体数等について改良し、プリオン病、特に BSE の診断技術を開発することを目的とする。本年度は牛 PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率、増幅条件の検討を行った。BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率はハムスター由来 PrP<sup>Sc</sup> に比べて低く、PrP<sup>C</sup> の非特異的凝集体が増幅反応中に形成されることが判明した。脳乳剤の抽出条件、PMCA 反応の増幅諸条件について検討を行ったが、満足いく増幅結果は得られなかった。牛 PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率改善には、非特異的 PrP<sup>C</sup> 凝集体形成を選択的に阻止できる方法の開発が不可欠である。

### A. 研究目的

異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の検出には、エライザ法やウェスタンブロッティング (WB) 法など免疫学的方法が用いられている。わが国が BSE 汚染国となった現在、より検出感度が高く、信頼性のある診断法が必要とされている。2001 年、PrP<sup>Sc</sup> を試験管内で増幅させる方法、protein-misfolding cyclic amplification (PMCA) 法が Saborio らによって報告された。PMCA 増幅を繰り返すことによって PrP<sup>Sc</sup> の超高感度検出が可能となり、感染ハムスターの血液からも PrP<sup>Sc</sup> が検出できることが示されている。ハムスター PrP<sup>Sc</sup> 同様、BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> も高効率に増幅可能であれば、BSE 検査や早期診断法として PMCA 法は革新的技術になり得る。本研究の目的は、BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> の至適増幅条件を明らかにし、BSE 検査法として実用化を図ることにある。本年度は、BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅の障害となる原因を検討するとともに、牛など各動物由来 PrP<sup>C</sup> の生化学的特性について解析した。

### B. 研究方法

1) PMCA : 原法に従い、0.5% TritonX100-4 mM EDTA-PBS (pH7.4) を用いて正常牛脳お

よび BSE 感染脳の 10%乳剤を作成した。BSE (英国由来) 感染脳乳剤は、1/10~1/500 の比で正常脳乳剤と混合し、100 µl/tube で反応を行った。エレコン社製交差超音波蛋白質自動活性化装置を用いて、3 秒発振-1 秒休止のパルス を毎時 3 回発振し、これを 1 サイクルとして 20 サイクルの増幅反応を行った。

2) WB 法 : PMCA 産物はプロティナーゼ K (PK) 消化後、HRP 標識 T2 抗体を用いて WB 法で検出した。

3) 増幅条件の検討 : 脳乳剤作製の際に使用する緩衝液の pH (6~9)、可溶化用界面活性剤 (Triton シリーズ、Brji シリーズなど)、反応温度 (4°C~37°C) を変え、増幅効果を調べた。また、抗プリオン抗体、各種変性剤等を反応系に加え、増幅に与える影響を解析した。

4) PrP の生化学的解析 : ハムスター、マウス、牛の正常脳乳剤を 2 次元電気泳動で分離後、WB を行い、各動物由来の PrP<sup>C</sup> の特性を比較した。

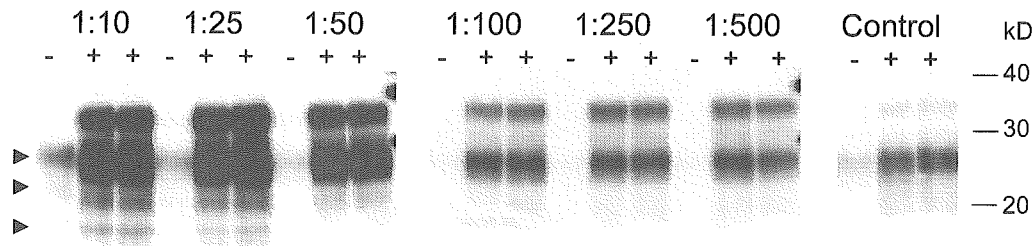


図1. BSE由来 PrP<sup>Sc</sup> の検出限界: +はPMCA増幅後のサンプル、-は増幅前のサンプルを示す。矢印はそれぞれ、2糖鎖、1糖鎖、無糖鎖型のPK抵抗性PrPバンドを示す。Controlは正常脳乳剤のみを用いて増幅した結果を示す。

### C. 研究結果

#### 1) 牛 PrP<sup>Sc</sup> のPMCA増幅結果

PMCA増幅後、WB法でPrP<sup>res</sup>を検出した結果を図1に示す。20サイクルの増幅反応により、10%感染脳乳剤を1:10-1:25に希釈したサンプルから2糖鎖、1糖鎖、無糖鎖(矢印で示す)のPrP<sup>res</sup>シグナルの増幅が確認できた。しかしながら、正常脳のみを用いて増幅反応を行った陰性コントロールサンプルからもPK抵抗性のPrPが検出され、これが高いバックグラウンドとなり、1:50以上の希釈率では増幅の有無の判定が困難であった。また、増幅諸条件を検討したが、著しい増幅効率の改善は見られず、ハムスタープリオン株のような高効率増幅は困難であった。

#### 2) 牛 PrP の性状解析

図2に2次元電気泳動後、WBを行い、PrPを検出した結果を示す。PrPのアミノ酸配列から推定される等電点(pI)は約9であるが、生体内では糖鎖末端に酸性糖であるシアル酸の修飾を受けているため、多くのPrP分子のpIは5付近にある。ハムスターPrPでは、シアル酸の修飾を受けていない、もしくは修飾の程度が低い分子種も見いだされるのに対して、牛PrPではそのような分子種はほとんど存在しなかった。また、マウスPrPでは、ハムスターと牛の中間的な糖修飾パターンが見られた。

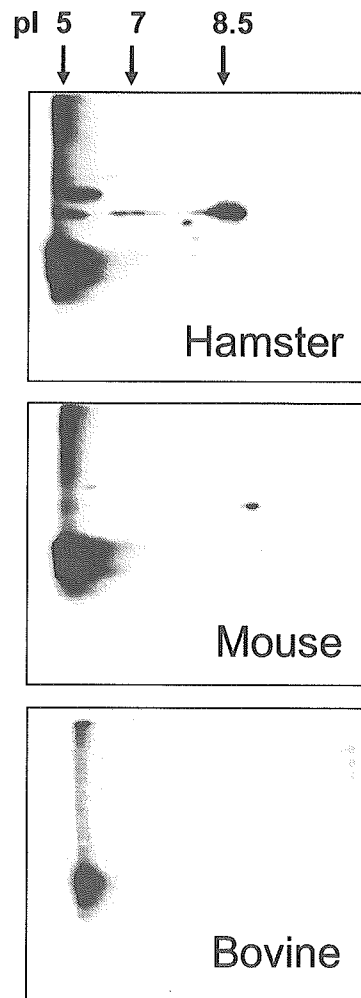


図2. 2次元電気泳動後、各PrPcをWB法で検出した。

### D. 考察

ハムスターSc237株を用いた増幅では非常に良好な結果が得られる。40サイクルのPMCA反応では10%感染脳乳剤を $10^{-7}$ に希釈したサンプルからもPrP<sup>res</sup>を増幅・検出可能で

あり、これはバイオアッセイと同等もしくはバイオアッセイを凌ぐ検出感度である。現在までにハムスターに加えて、マウス、羊由来のPrP<sup>Sc</sup>のPMCA増幅を行っているが、動物種、ある

いはプリオン株によって増幅条件の最適化を行う必要があり、界面活性剤の種類、超音波強度、パルス発振時間、インキュベーション時間、サイクル数、反応温度等が増幅結果に影響を与えることが判明している。

牛における低増幅効率の原因として、本実験で用いた BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> は自然感染牛から調整されたサンプルであり、ハムスターやマウスなど実験感染動物と比べて含有される PrP<sup>Sc</sup> 量が少なかったということが考えられる。加えて、牛では正常脳乳剤のみを超音波処理しても PK 抵抗性の PrP が生成されることも関連していると考えられる。タンパク質溶液を超音波処理すると、バブル消滅時に発生する張力、局所的高温化やフリーラジカル形成などにより、タンパク質の unfolding が誘導され、凝集体形成が促進されることが報告されている。ハムスター PrP<sup>c</sup> にはこの傾向はほとんど認められないが、牛では特にこの PrP<sup>c</sup> 凝集体形成能が高く、PrP<sup>c</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換が阻害されている可能性が考えられる。非特異的 PrP<sup>c</sup> 凝集体の形成は温度依存性であり、4℃では全く形成されないが、PMCA 反応も生じない。現状では、非特異的 PrP<sup>c</sup> 凝集体形成と PrP<sup>res</sup> 増幅反応を分離できておらず、したがって長時間のインキュベーションや PMCA 産物を希釈し、増幅反応を繰り返す方法は有効でない。

PrP<sup>c</sup> の 2 次元電気泳動の解析から、PrP<sup>c</sup> の糖鎖修飾パターンがハムスターと牛では異なっていることが明らかになった。シアル酸は分子間結合に関わっていると考えられており、PrP 分子間で構造変換が誘導される際に、シアル酸の有無が変換効率に影響を与えている可能性が考えられた。今後、糖修飾パターンと増幅効率の関連を解析するとともに、リコンビナント（大腸菌および昆虫細胞由来）牛 PrP を PrP<sup>c</sup> ソースに用いて増幅効率を検討する予定である。

## E. 結論

BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> では、ハムスター PrP<sup>Sc</sup> のような効率的な試験管内増幅は困難であった。牛では超音波照射によって PrP<sup>c</sup> の非特異的凝集体が形成され、PrP<sup>res</sup> への構造変換が阻害されて

いる可能性が考えられた。非特異的 PrP<sup>c</sup> 凝集体の蓄積を選択的に防止できれば、牛でも高効率 PrP<sup>res</sup> 増幅を実現できる可能性はある。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Murayama Y, Yoshioka M, Horii H, Takata M, Miura K, Shinagawa M: Specific detection of prion antigenic determinants retained in bovine meat and bone meal by flow microbeads immunoassay. J Appl Micro. (in press)
- 2) Yoshioka M, Miwa T, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Nishizawa K, Watanabe M, Shinagawa M, Murayama Y: Characterization of a proteolytic enzyme derived from a Bacillus strain that effectively degrades prion protein. (submitted)
- 3) 村山裕一: 増殖するタンパク質、プリオン。フィールド科学への招待、京都大学学術出版会、印刷中。

### 2. 学会発表

- 1) 村山裕一、吉岡 都、高田益宏、横山 隆、品川森一: PMCA 法による異常プリオン蛋白質不活化法の有効性の検討。2005 年プリオン研究会（天童）2005.8.
- 2) 吉岡 都、村山裕一、高田益弘、横山 隆、品川森一: 全自動 PMCA 装置を用いた BSE 由来異常プリオン蛋白質の高感度検出。第 138 回日本獣医学会（鹿児島）2005.8.

## 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

## 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

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

研究協力者 舩甚賢太郎、岩丸祥史、今村守一、品川森一  
(動物衛生研究所プリオン病研究センター)

研究要旨 牛プリオン蛋白質 (PrP) 過発現トランスジェニックマウス (TgBoPrP) を用いて、牛海綿状脳症 (BSE) の伝達試験を行った。非定型 BSE (本邦 8 例目)、若齢型 BSE (本邦 9 例目) の伝達試験を継続しているが、現在までのところ両症例の TgBoPrP への伝達性は認められていない。定型 BSE プリオンを野生型マウスおよび各種 PrP を発現するトランスジェニックマウスへ伝達し、プリオンの感受性、蓄積した異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の性状の解析を行った。その結果、BSE プリオンのハムスターへの伝達性の有無は PrP131-188 に規定されることが示された。TgBoPrP で継代した BSE の伝達試験により、PrP のアミノ酸配列以外の要因が「種の壁」に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は単一株に起因すると考えられてきたが、イタリア、フランス、ベルギー、日本などでの非定型 BSE の報告から BSE プリオンが複数の株に分かれる可能性も考えなければならない。マウスへの継代による、我が国の BSE プリオンの性状解明が必要と考えられる。国内の BSE 症例の中で BSE/8 (非定型)、BSE/9 (若齢型) は固相酵素免疫測定法 (ELISA) の吸光度 (OD) 値も低く、ウエスタンブロット (WB) での PK 抵抗性プリオン蛋白質 (PrP) の蓄積量も少なかった。このことから、野生型マウスでの解析に先立ってプリオンの増幅が必要と考えられた。そこで、牛型 PrP 過発現マウス (TgBoPrP) を用いた両症例由来のプリオンの増幅を試みる。

BSE プリオンはマウス、ヒツジ、サルへの伝達が認められているが、ハムスターへの伝達は示されていない。マウスとハムスターキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウス (MHM2, MH2M) を用いて BSE プリオンの「種の壁」を規定するメカニズムについて検討する。

### B. 研究方法

1) わが国の BSE 各症例について TgBoPrP マウスへ脳内接種を行い、伝達性の有無を確認する。死亡マウスについては、WB および免疫組織化学 (IHC) により異常プリオン蛋白質

(PrP<sup>Sc</sup>) の有無を検討する。

2) BSE 脳乳剤、野生型マウス初代および 2 代継代 BSE プリオンをマウスおよび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 (MHM2, MH2M) 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。また、TgBoPrP で継代した BSE プリオンについても同様の解析を行い、「種の壁」のメカニズム解明を試みる。

### C. 研究結果

1) BSE/8 脳試料を接種した 5 匹のトランスジェニックマウスのうち、4 匹が死亡または衰弱したことから検査を行った。接種 539 日後の症例は WB、IHC とともに陰性と判断された。769 ~ 771 日で採材した 3 匹のマウスの WB は陰性と判断された (IHC は検査中)。BSE/9 試料を接種したマウスにも、現在まで発症は認められていない (表 1)。

表1. 非定型BSE等の伝達試験(経過)

Inoculum	mice	n/n <sub>0</sub>	incubation periods (days)	WB	IHC
BSE/8 <sup>th</sup> / atypical BSE	TgBoPrP	4/5	539 769, 771, 771 >771 (still alive)	-	-
BSE/9 <sup>th</sup> / young BSE	TgBoPrP	2/6	512 577 (death) >649 (4 mice are still alive)	-	-
BSE/Kanagawa / Suspend	TgBoPrP	0/7	>649 (7 mice are still alive)	-	Not done
BSE/UK	TgBoPrP	11/11	223.5 ± 13.5	+	+

2) BSE プリオンは野生型マウス (CD-1)、MHM2、Tga20 にはそれぞれ約 400 日以上 of 潜伏期で伝達が認められたが、MH2M、TgHaNSE への伝達性は認められなかった。このことから BSE プリオンのハムスターへの伝達性は領域 PrP 131-188 に規定されることが明らかとなった (表 2)。この領域にはマウスとハムスターの間で I139L, Y155N, S170N のアミノ酸置換が存在する。また、Tga20 の BSE (初代) に対する潜伏期が 456 日と CD-1 よりも長いことから、初代の感受性は PrP の過発現では変化しないと考えられた。マウスで 1 回継代した BSE プリオンは MH2M、TgHaNSE に伝達性を示したことから、異種動物での継代によりプリオンの生物学的性状が変化することが示された。

表2. BSEプリオンの各種マウスへの伝達性

	BSE (1st)	BSE/R1H1 (2nd)	BSE/R1H1/CD-1 (3rd)	Obihiro mouse	Sc237 hamster
CD-1	408.6±28.2 <sup>1)</sup>	196.8±8.4	173.6±7.9	150±2.5	>600
MHM2	399.6±56.7	127.7±4.3	123.8±2.4	159.1±7.4	420.5±17.2
MH2M	>600	212.8±16.4	185.0±3.4	168.8±7.9	102.3±3.6
Tga20	456.5±49.5	122.3±11.3	123.6±2.4	78.3±2.9	N.D. <sup>2)</sup>
TgHaNSE	>600	153.1 ± 1.1	164.4±6.8	177.4 ± 7.1	47.2±3.6

1): incubation periods (days, mean ± SD

2): not done

Mice were intracerebrally inoculated 10% brain homogenates.

3) BSE (牛) および TgBoPrP で継代した BSE プリオンについて、各トランスジェニックマウスでの潜伏期を比較した。両者は、TgBoPrP に対する潜伏期には変化が認められなかった。MH2M および TgHaNSE はいずれのプリオンに対しても抵抗性を示した。しかし、CD-1、Tga20、MHM2 では TgBoPrP で継代した BSE プリオンは、牛由来の BSE プリオンに比べて短い潜伏期を示した。特に、MHM2 での潜伏期の短縮は顕著であった (表 3)。

表3. TgBoPrP (牛型PrP過発現マウス)に伝達したBSEプリオンの性状の解析

	BSE		BSE/TgBoPrP	
	n/n <sub>0</sub> <sup>2)</sup>	潜伏期	n/n <sub>0</sub>	潜伏期
CD-1	5/5	408.6 ± 28.2	7/7	347.2 ± 55.9
TgBoPrP	11/11	223.5 ± 13.5	7/7	226.7 ± 20.7
MHM2	6/6	399.6 ± 56.7	5/5	222.0 ± 11.9
MH2M	0/6	No Disease	0/8	>446 <sup>1)</sup>
Tga20	5/5	456.5 ± 49.5	0/5	348.6 ± 57.9
TgHaNSE	0/7	No Disease	0/7	>426 <sup>1)</sup>

1) TgBoPrPはInPro社より購入

2) n:発症マウス/n<sub>0</sub>:接種マウス

3) 2005年12月28日現在までの経過日数 (経過観察中)

## D. 考察

MHM2 はマウス継代 BSE プリオンに対し高い感受性を示した。野生型マウスと Tga20 の潜伏期に差が認められなかったことは、異種 PrP のコピー数の増加では、初代の「種の壁」が越えられないことを示している。

潜伏期を指標とした場合、CD-1 への BSE プリオンの馴化には 3 代以上の継代が必要と考えられた。初代の伝達は PrP の過発現で潜伏期・感受性が変化しない過程と考えられた。2 代目以降の過程は PrP の過発現で潜伏期が短縮される過程、すなわち PrP がそのメカニズムに関与する過程と考えられた。プリオンの「種の壁」には複数の過程が関与していると考えられた (図 1)。

また、TgBoPrP で継代したプリオンが BSE とは異なる性状を示したことは、PrP 分子以外の「種の壁」に関与する因子の関与が考えられた。

プリオンの馴化:野生型マウスでの潜伏期の結果は3代以上の継代が必要

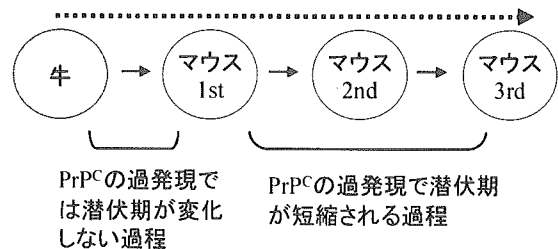


図1. プリオンの馴化のメカニズム

## E. 結論

BSE プリオンのハムスターへの伝達性の有無は PrP131-188 に規定されることが示された。TgBoPrP で継代した BSE の伝達試験により、PrP のアミノ酸配列以外の要因が「種の壁」に関与する可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sekiya S, Noda K, Nishikawa F, Yokoyama T, Kumar PKR, Nishikawa S: Characterization and application of a novel RNA aptamer

- against the mouse prion protein. J Biochem. (in press)
- 2) Yokoyama T, Shimada K, Tagawa Y, Ushiki YK, Iwamaru Y, Hayashi HK, Shinagawa M: Western blot assessment of prion inactivation by alkali treatment in the process of horticultural fertilizer production from meat meal. Soil Sci Plant Nutr. (in press)
  - 3) Kobayashi Y, Kohno N, Wanibe S, Hirayasu K, Uemori H, Tagawa Y, Yokoyama T, Shinagawa M: A solid-phase immunoassay of protease-resistant prion protein with filtration blotting involving sodium dodecyl sulfate. Anal Biochem, 2005. (in press)
  - 4) Shimada K, Hayashi HK, Ookubo Y, Iwamaru Y, Imamura M, Takata M, Schmerr MJ, Shinagawa M, Yokoyama T: Rapid PrP<sup>Sc</sup> detection in lymphoid tissue and application to scrapie surveillance of fallen stock in Japan: variable PrP<sup>Sc</sup> accumulation in palatal tonsil in natural scrapie. Microbiol Immunol 2005, 49:801-804.
  - 5) Miyamoto K, Nakamura N, Aosasa M, Nishida N, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H: Inhibition of prion propagation in scrapie-infected mouse neuroblastoma cell lines using mouse monoclonal antibodies against prion protein. Biochem Biophys Res Commun 2005, 335:197-204.
  - 6) Hayashi HK, Yokoyama T, Takata M, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, Shinagawa M: The N-terminal cleavage site of PrP<sup>Sc</sup> from BSE differs from that of PrP<sup>Sc</sup> from scrapie. Biochem Biophys Res Commun 2005, 328:1024-1027.
  - 7) Yokoyama T, Kimura, KM, Shinagawa, M: Bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Japan. In Kitamoto T (Ed) Prions food and drug safety, Springer-Verlag Tokyo, pp99-108, 2005.
- scrapie-infected and uninfected hamsters. Prion 2005, October, 2005, Germany, p170.
- 2) Yokoyama T, Shimada K, Masujin K, Ushiki YK, Iwamaru Y, Imamura M, Kimura KM, Shinagawa M. Both host prion protein 131-188 subregion and prion characteristics regulate glycoform of abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). Prion 2005, October, 2005, Germany, p221.
  - 3) Hayashi HK, Takata M, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, Shinagawa M, Yokoyama T: The N-terminal cleavage site of PrP<sup>Sc</sup> from BSE differs from that of PrP<sup>Sc</sup> from scrapie. Prion 2005, October, 2005, Germany, p342.

#### 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. 学会発表

- 1) Tsukui K, Nakajima K, Takata M, Yokoyama T, Onodera T: Search of proteinase K-resistant PrP in plasma from

## 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—

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学病態獣医学講座

研究協力者 岡地 潔、横山雄市（帯畜大・病態獣医）、堀内基広（北大獣医・プリオン病学）、品川森一（動衛研・プリオン病研究センター）、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）

研究要旨 2001 年から 2003 年に国内のと畜場で摘発された BSE6 頭を RIII、C57BL、I/LnJ の 3 系統のマウスに脳内接種を行い、潜伏期および病理学的解析から本邦発生 BSE について基礎的知見の集積を行った。初代マウス発症までの潜伏期は RIII で 470-700 日、C57BL で 527-800 日、I/LnJ で 546-653 日であった。これは英国 BSE の接種成績と比較したところ、潜伏期の大幅な延長と接種 BSE 症例によってはマウス発症数の低下もみられた。これは英国での成績が臨床 BSE 症例に基づくものであるのに対して、本研究接種 BSE 症例がと畜場に搬入された臨床症状発症以前の亜臨床例であることに起因するものと考えられた。しかしながら、マウス系統間でみられる潜伏期の傾向は、RIII < C57BL < I/LnJ であり諸外国で報告のある BSE と同様の生物学的性状を反映していた。免疫組織化学的パターンについてはこれまでの報告にほぼ一致し、延髄・中脳の脳幹部、視床、大脳皮質にいずれのマウスでも共通して陽性がみられた。また、C57BL マウスに特異的にみられた線条体での陽性もこれまでの報告に一致していた。しかしながら、I/LnJ マウスにおけるグリア状、あるいは星状陽性パターンや C57BL マウス小脳分子層の PrP プラークについての記載はなく、さらに、これらの所見は二代目マウスでも受け継がれていたことから、これらについては新たな特徴として付記されるべき所見と考えられた。また、これらマウスの継代による BSE マウス馴化株の研究資源としての提供が可能となった。

### A. 研究目的

BSE は生化学的に同一ないわゆる一つの株により伝播されていると考えられていたが、2003 年これら従来型とは異なる非定型的 BSE の報告がイタリア、フランス、日本から相次いでなされた。このような株の問題は糖鎖パターンや PK 抵抗性といった生化学的な手法のみならず、病理学的な検索や膨大なマウスへの伝達試験の成績に基づいている。また、BSE と vCJD の関連やあるいは猫科動物を含む他種動物における TSE との関連についてもその検証にはこれらマウスへの伝達試験の成績に負うところが大きい。英国では、BSE の評価に生化学的な性状解析に加え、プリオン蛋白のアミノ酸型が異なるマウス 3 ないし 4 系統を用い、

潜伏期および lesion profile (脳の 9 あるいは 12 箇所部位の空胞変性重篤度をスコア化) から分類を行っている。

本邦では 2001 年 9 月に国内で最初の BSE の摘発、10 月には全頭検査が開始され、斃死牛での摘発を含め現在までに 22 頭の BSE が摘発されている。このような背景の中、本研究では全頭検査開始後と畜場で摘発された 2003 年までの 6 頭の BSE について 3 系統のマウスへの伝達試験を実施し、マウスにおける潜伏期および病理学的解析より本邦発生 BSE についての基礎的な知見の集積を目的とした。さらに、本邦 BSE 由来マウス株の樹立による研究資源化も本研究の重要な目的の一つとなっている。



## B. 研究方法

と畜場で摘発された BSE6 頭 (TE, KUS, SA, WA, KA, KI) の 10%脳乳剤をプリオン蛋白のアミノ酸型の異なる RIII、C57BL、I/LnJ の 3 系統の野生型マウスに脳内接種を行い、これを初代マウスとした (表 1)。これらマウスが臨床症状を示し、かつ終末期に至るまで観察を行い、解剖を行った。病理学的解析のためにはホルマリン固定による採材を、また、今後の生化学的解析用と継代のためには脳および脾臓を凍結した。

さらに凍結材料のうち、TE、KUS 接種初代マウスの 10%脳乳剤をそれぞれのマウスに接種し、これを二代目マウスとした。これらについても、終末期に同様の方法にて採材を行った。

病理学的解析のために、ホルマリン固定後、通常の方法によりパラフィン包埋し、薄切標本を作製した。標本は脱パラフィン後、135°C オートクレーブ 20 分 (135DWA 法) の前処理後、B103、43C5 抗体を用いて免疫組織化学的染色実施した。また、アストログリア、ミクログリアの検索のためにそれぞれ GFAP、RCA-1 レクチンによる染色を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

BSE 症例それぞれについて潜伏期の平均および発症数/接種数について表 1 にまとめた。また、初代マウスでは潜伏期の長さに差が多くみられたため、図 1 にはマウス個体ごとに発症あるいは死亡日数を示した。初代マウスではマウス系統に関わらず KUS、KA では比較的伝達日数が短かった。一方、WA と KI (KI は C57BL

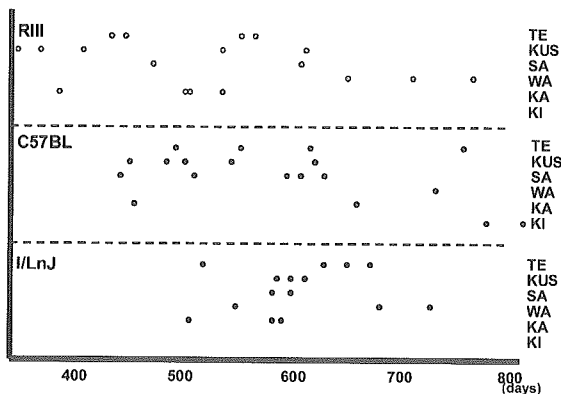


図 1. BSE 初代マウス発症日数

のみの成績による) では発症までの経過が長い傾向にあり、発症あるいは陽性を示すことなく死亡する動物数も比較的多くみられる傾向がみられた。図 1 ではそれぞれの BSE のマウス間の発症日数および BSE 間において相当のばらつきがみられているものの、 $RIII < C57BL < I/LnJ$  に従い潜伏期が長くなる傾向がみられた。一方、TE および KUS の二代目マウスではその潜伏期は 150~180 日と短縮し、発症日数にはほとんどばらつきがみられなくなった。

病理学的検索では今回接種した BSE6 頭については、マウスの系統間にみられる病変パターンおよび免疫組織化学的パターンに違いはみられるものの、同一系統のマウスにみられる変化に差はみられなかった (図 2)。免疫組織化学的

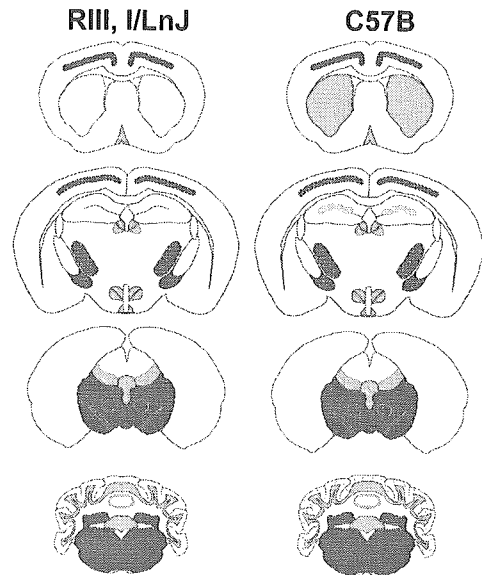


図 2. PrP<sup>Sc</sup> 免疫染色による陽性分布

病変分布では、RIII および I/LnJ はほぼ同様の分布パターンを示したが、C57BL ではこれら所見に加え、線条体および海馬に陽性所見が得られた。さらに、C57BL では小脳分子層に特徴的な斑状の陽性所見 (PrP プラーク) が得られ、これは RIII および I/LnJ には認められなかった (図 3)。また、視床を中心に染色パターンに明瞭な違いが観察された。RIII および C57BL では神経細胞周囲に陽性を示すのに対して、I/LnJ ではグリア細胞に一致した星状の染色パターンを示すのが特徴であった (図 4)。二代目マウスにおいてもこれら陽性分布パターン、あるいは染色パターンは維持されていた。

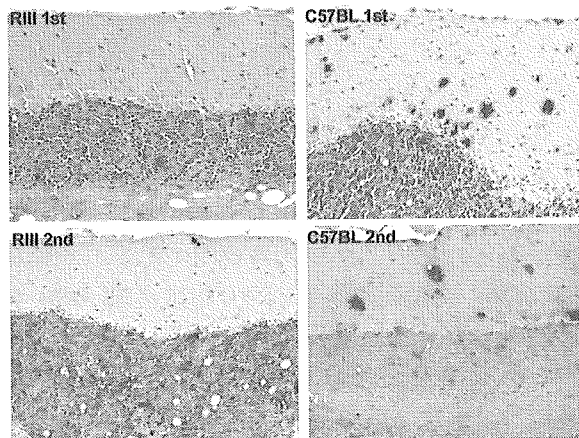


図3. 小脳分子層 PrP<sup>Sc</sup> 免疫染色

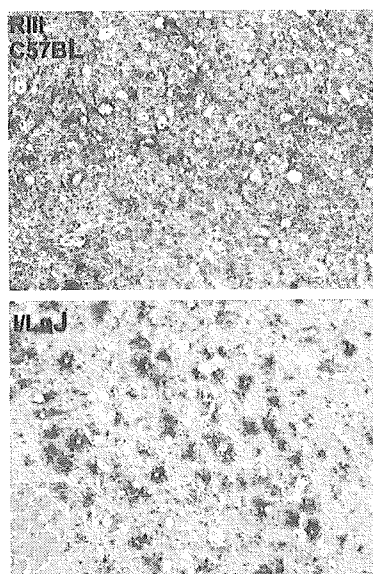


図4. 視床 PrP<sup>Sc</sup> 免疫染色

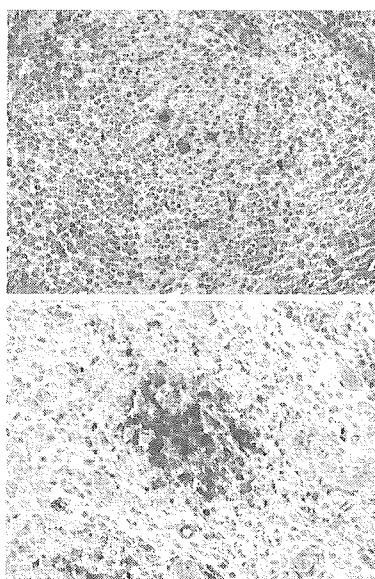


図5. 脾臓の PrP<sup>Sc</sup> 免疫染色

初代マウスではいずれのマウス系統においても脾臓の免疫組織化学的染色で軽度の陽性が観察された。二代目マウスではその陽性領域は拡大していた (図 5)。

#### D. 考 察

英国では RIII、C57BL、VM、C57BL×VM といった系統のマウスを用いスクレイピー株の分類を行ってきた。これらのマウス系統はスクレイピーの潜伏期間を規定するプリオン蛋白のアミノ酸型が異なり、これと合わせて病理学的な空胞の分布違いや重篤度に基づき株の分類がなされてきた。このような知見の集積や方法論を利用して BSE に関する株の問題や生物学的性状の解析、あるいは他の動物における TSE との関連が検討されてきた。これら経緯より本邦発生 BSE についても同様に同系統のマウスに伝達試験を実施し、その結果について若干の考察を加えた。

英国の BSE を RIII、C57BL、VM マウスに接種した場合の潜伏期間については報告により若干の違いはみられるものの、それぞれおよそ平均 300 日、400 日、500 日とされている。本研究では VM マウスに変えて I/LnJ マウスを使用しているため単純に比較はできないが、本邦 BSE の初代マウスでの平均は、比較的早期に発症している KUS 例においても RIII、C57BL、I/LnJ マウスで、それぞれ 462 日、527 日、546 日と英国 BSE 例に比較して大幅な延長がみられている。このことは、英国の実験では臨床的 BSE が使われているのに対して、今回の研究では臨床症状を示さずにと畜場に搬入され、摘発された亜臨床例であり、接種材料に比較的プリオンの蓄積量が少ないことに起因している可能性が考えられた。潜伏期の長さに差が多くみられることや症例によっては発症数が少ないことも同様に、BSE の経過に依存する部位による蓄積量の差を反映している可能性が考えられた。

また、前述したように、同じ BSE を接種した初代マウスでの潜伏期の長さには差がみられるものの、本邦 BSE に関しても英国 BSE のマウス系統による接種成績の傾向に一致し、これまで諸外国で報告されている BSE の生物学的性状を反映した成績と考えられた。

初代マウスにおける lesion profile の比較も BSE、他の動物 TSE、あるいは vCJD の生物学的性状比較の点で重要とされているが、それぞれの BSE あるいは TSE についてそれぞれ数十匹のマウスを用いて平均化し、スコア化する必要もあり、限られたマウスを用いた本研究では作成し得なかった。しかしながら、本研究マウスにみられた空胞形成部位についてはこれまでに報告されたものと矛盾はみられなかった。

一方、免疫組織化学的パターンについてはこれまでの報告にほぼ一致し、延髄・中脳の脳幹部、視床、大脳皮質にいずれのマウスでも共通して陽性がみられた。また、C57BL マウスでの線条体での陽性もこれまでの報告に一致していた。しかしながら、VM と I/LnJ マウスとの違いによるためか、本研究でみられた I/LnJ マウスにおけるグリア状、あるいは星状陽性パターンや C57BL マウス小脳分子層の PrP プラークについての記載はなく、また、これらの所見は二代目マウスでも受け継がれていたことから、これらについては新たな特徴として付記されるべき所見と考えられた。

脾臓における蓄積はいずれのマウス系統においても初代マウスでは非常に軽度であるのに対して、二代目マウスでは蓄積は顕著に増加してみられた。このことの意義については不明であるが、マウスへの馴化に際してのひとつの特徴とみなされるべき所見かもしれない。

二代目マウスの発症までの時間は英国の報告にほぼ一致するか、系統によってはそれより短く、また、発症までの日数にばらつきもみられないことから、現在さらに三代目接種を行い、BSE マウス馴化株として研究資源のために提供

予定である。

## E. 結 論

本邦発生 BSE 6 頭を RIII、C57BL、I/LnJ の 3 系統のマウスに伝達を行った。初代マウス発症までの潜伏期は英国 BSE に比較して、大幅な延長がみられたが、マウス系統間でみられる潜伏期の傾向と免疫組織化学的分布は英国 BSE 例と同様であった。接種試験の成績は諸外国で報告のある BSE と同様の生物学的性状を反映していた。また、これらマウスの継代による BSE マウス馴化株の作成、研究資源としての提供が可能となった。

F. 健康危険情報 とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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)

### 2. 学会発表

- 1) 岡地 潔、横山雄市、古岡秀文、堀内基広、品川森一、山河芳夫、佐多徹太郎：国内発生 BSE 初代伝達マウスに関する病理組織学および免疫組織化学的研究。第 140 回日本獣医学会（鹿児島）2005.9.
- 2) 岡地 潔、横山雄市、古岡秀文、堀内基広、品川森一、山河芳夫、佐多徹太郎：国内発生 19 例目 BSE の脳に関する免疫組織化学的研究。2005 年プリオン研究会（山形）2005.8.

表 1. 本邦 BSE を脳内接種したマウスの潜伏期

	TE	KUS	SA	WA	KA	KI
Primary passage						
BSE→RIII	501.5±66.9 (4/5)	467.2±112.4 (5/5)	541.5±87.0 (2/4)	708.7±62.1 (3/4)	480.0±64.5 (4/4)	-
BSE→C57/BL	604.0±115.0 (4/5)	527.6±61.7 (5/5)	554.0±79.0 (5/6)	737 (1/5)	571.5±104.5 (2/5)	800.5±30.4 (2/5)
BSE→I/LnJ	615.5±68.3 (4/5)	546.5±91.5 (3/5)	590.5±10.0 (2/5)	653.3±93.9 (3/5)	564.0±42.7 (3/5)	-
Second passage						
RIII→RIII	158.0±5.8 (3/4)	169.2±8.2 (5/5)				
C57/BL→C57/BL	186 (1/1)	179 (1/1)				
I/LnJ→I/LnJ	-	146.8±12.8 (5/5)				

## 9. プリオン感染に対する宿主応答と体内伝播

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

研究要旨 動物プリオン病の感染は、経口的に摂取された異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) が免疫系細胞に捕食された後に神経系繊維に取り込まれ中枢神経系へ上向性に移動して発症すると考えられている。しかし、腸管に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> がどのような細胞にとりこまれ宿主の応答をかいくぐって複製するかは不明である。本年度は培養系の牛マクロファージを用いてマクロファージへの PrP<sup>Sc</sup> の取り込みと分解能に関して解析した。牛マクロファージ Bo120 は FITC 標識ラテックスを高率に取り込み、培養液への LPS の添加により MHC-II や CD14 分子が誘導されたことから、Bo120 は旺盛な食食能を有するマクロファージと思われる。また、マウススクレイピー帯広株の 1% 脳乳剤を培養細胞に添加した場合も Bo120 株は PrP<sup>Sc</sup> を旺盛に取り込むことが IFA で明らかになった。Bo120 株に 1% 脳乳剤を添加すると、添加後 4~6 日位から顕著な PrP<sup>Sc</sup> の分解が WB により観察された。脳乳剤添加後の細胞の継代によっても急速に減少した。これらの事実は腸管から取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> は腸管リンパ小節内のマクロファージにより分解されている可能性を示唆している。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は、飼料中に混在した異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の摂取により感染し、長い潜伏期を経て、中枢神経に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することにより発症する。実験的な経口感染実験の場合を除いて、PrP<sup>Sc</sup> の摂取時期や PrP<sup>Sc</sup> を摂取した直後の生体反応についてはほとんど不明である。また、PrP<sup>Sc</sup> に濃厚汚染された肉骨粉を給与された英国の牛群においてさえも、BSE 発症に至る感染高率は低い。日本においても同じ飼料を給仕された同居牛群において BSE 感染牛は摘発されていない。このことは多くの牛が PrP<sup>Sc</sup> を飼料と共に摂取するが、発症にいたっていないことを示している。自然感染例では PrP<sup>Sc</sup> に感染した時期を特定できないことから、PrP<sup>Sc</sup> に対する感染初期の宿主応答を解析することは極めて難しい。さらに、腸管にて取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> が腸管の細胞や組織にて複製した後に神経系に移行すると考えられているが、BSE 感染においてどのような細胞が免疫系と神経系の仲立ちをしているのかは未だ明らかではない。

マウスにプリオンを感染させて発症させたマウススクレイピーでは、投与した PrP<sup>Sc</sup> が濾胞樹状細胞 (FDC) やそのネットワークにて複

製・増幅後、神経系へと移行する。B 細胞を欠損させたマウスでは FDC が成熟しないことからプリオンの複製も発症も観察されない。プリオン病のマウスモデルにおいては、B 細胞—FDC 系の免疫ネットワークがプリオン病発症には必要である。実際、スクレイピー感染マウスにおいては FDC に PrP<sup>Sc</sup> が多く蓄積されていることが観察されている。しかし、BSE 自然感染例においては、牛 FDC に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積している症例は少ない。マウススクレイピーと BSE では PrP<sup>Sc</sup> の初期感染時での増幅細胞や神経系への移動に関与する細胞が異なることが示唆される。

本課題では牛の腸管での PrP<sup>Sc</sup> に対する宿主の初期応答を細胞レベルで明らかにする目的で、腸管リンパ組織で中心的役割を果たすと考えられるマクロファージ、樹状細胞、FDC について検討した。本年度は、腸管の M 細胞から取り込まれた外来抗原を処理するマクロファージについて、PrP<sup>Sc</sup> の取り込み能や分解能に関して解析した。

### B. 研究方法

#### 1) 牛マクロファージ株と培養法

牛マクロファージ Bo120 株は健康なホルス