

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

本年度は該当なし。

2. 実用新案登録

本年度は該当なし。

3. その他

本年度は該当なし。

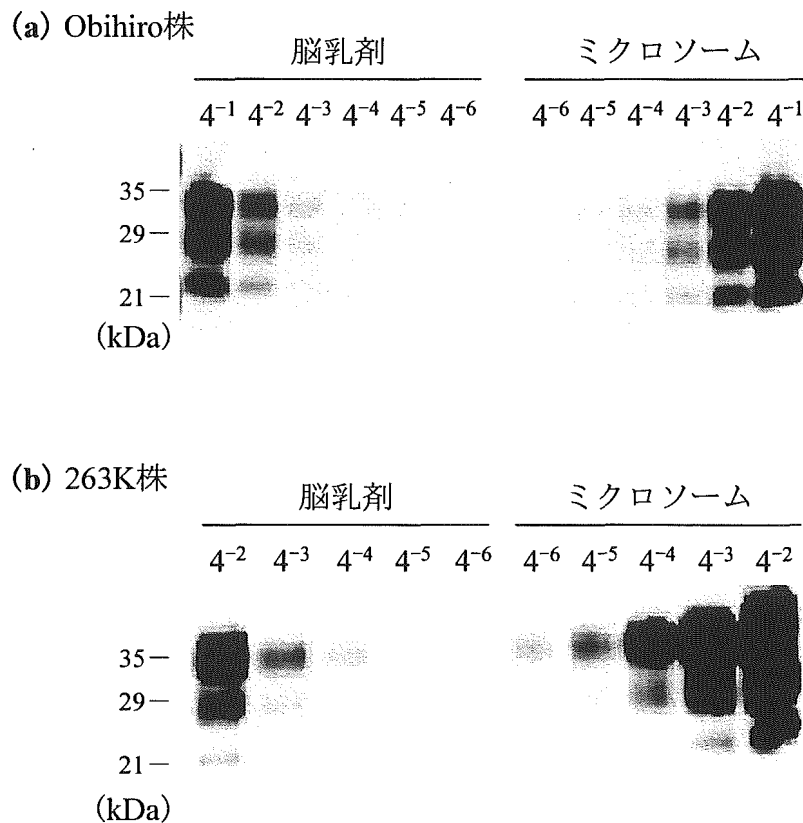


図1 ミクロソーム画分調製による PrP^{Sc} の濃縮

(a)・(b)

Obihiro 株感染マウス (a) 及び 263K 株感染ハムスター (b) から調製した各脳乳剤及び各マイクロソーム画分を PK 処理した後、1 × 試料用緩衝液で 4 倍段階希釈して電気泳動した。各々のバンド強度を定量し、脳乳剤中に含まれる PrP^{Sc} 量を 1 としたときのマイクロソーム画分の PrP^{Sc} 量の相対値を算出した結果、マイクロソーム画分を調製することによる PrP^{Sc} の濃縮率は Obihiro 株で 2.6 倍、263K 株で 9.8 倍であった。

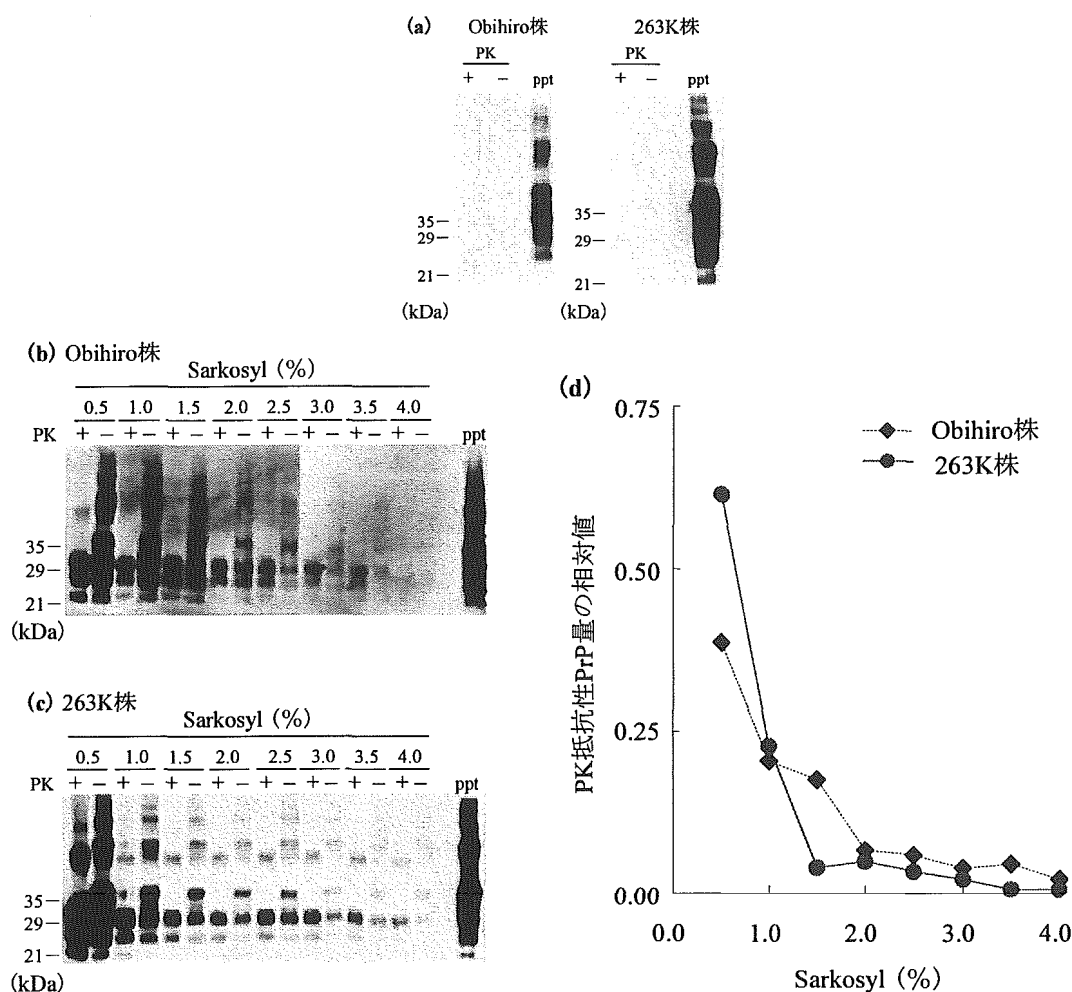


図2 Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分からの Sarkosyl による PrP 抽出

(a) Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染ハムスターの脳から調製した脳乳剤を $100,000 \times g$ で 10 分間遠心することにより得られた上清 (PK 処理(+), 非処理(-)) 及び沈殿 (ppt) 中の PrP を、WB により検出した。

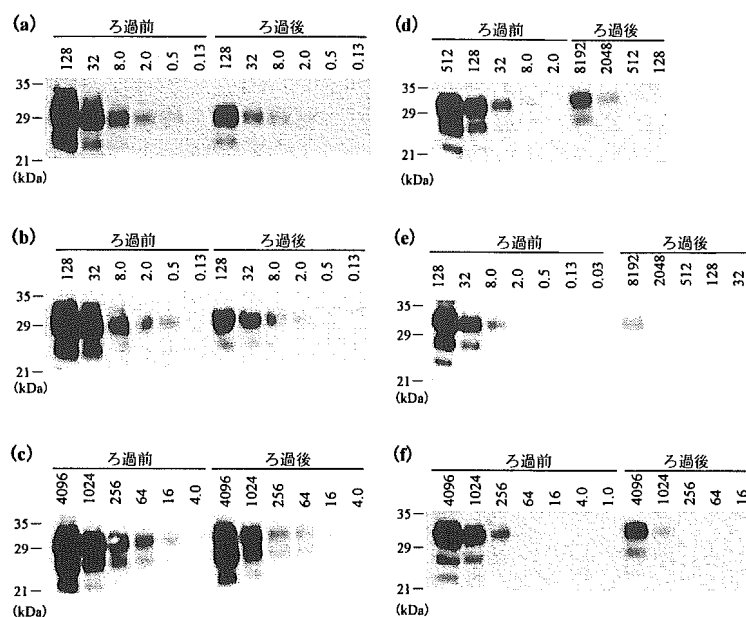
(b)・(c)

Obihiro 株感染マウス (b) 及び 263K 株感染ハムスター脳 (c) から調製した各マイクロソーム画分 10 μ L (脳組織 30 mg 相当) に Sarkosyl を最終濃度 0.5 % となるよう加え、液量が 100 μ L となるよう PBS を添加し、攪拌及び超音波処理を行った後、 $100,000 \times g$ の遠心を 10 分間行い、その遠心上清を 0.5 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分とした。これを 40 μ L ずつ 2 本にサンプリングし、一方は PK 処理を実施し (PK 処理(+))、もう一方は PK 処理を行わなかった (PK 処理(-))。

0.5 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を除いて得られた遠心沈殿に、1.0 % Sarkosyl を含む PBS を 100 μ L 加え、上と同様に攪拌、超音波処理及び遠心操作を行って、その遠心上清を 1.0 % Sarkosyl 連続処理マイクロソーム画分とした。その後、Sarkosyl 濃度を 0.5 % ずつ段階的に上げながら 4.0 % になるまで、各沈殿からの連続抽出を実施し、1.5 ~ 4.0 % Sarkosyl 連続処理/抽出マイクロソーム画分をそれぞれ得た。

なお、4.0 % Sarkosyl 連続抽出マイクロソーム画分を除いて得られた遠心沈殿 (ppt) から調製した検出用試料のアプライ量 (脳組織当量) は、他の試料の 1/2 量相当。

(d) (b)・(c) 記載の方法により各 Sarkosyl 濃度で連続抽出された PK 抵抗性 PrP (PrP^{res}、PK(+)) の総和に対する各画分中の PrP^{res} 量の割合。2 回繰り返し実施した平均値。



(g)

スパイク用病原体試料		RF	
		PBS	抗 HBs 人免疫グロブリン
マイクロソーム画分	実験 1	0.6	2.4
1 % Sarkosyl 処理	実験 1	0.6	2.4
マイクロソーム画分	実験 2	0.8	—
3 % Sarkosyl 抽出	実験 1	0.7	0.6
マイクロソーム画分	実験 2	0.7	0.8

図 3 孔径 0.22 μm の PVDF 膜を用いた PrP のろ過

- (a) 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を PBS に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μm の PVDF 膜でろ過した。ろ過前液及びろ液からの PrP^{Sc} 検出用試料の調製は「B. 研究方法」に示した方法に従って行った。試料を 4 倍段階希釈して各レーンにアプライし、検出限界を確認した。各レーン上の数字はアプライした脳組織当量 (μg) を示す。免疫染色には西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗 PrP 抗体 mAb31C6 を使用し (「G. 研究発表」論文 12)、酵素抗体直接法により PrP を検出した。
- (b) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を PBS に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μm の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (c) 263K 株感染ハムスター脳由来 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を PBS に 1/4 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μm の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (d) 263K 株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μm の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (e) 263K 株感染ハムスター脳由来 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/100 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μm の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (f) 263K 株感染ハムスター脳由来 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 抗 HBs 人免疫グロブリン溶液に 1/4 量スパイクした病原体溶液を、孔径 0.22 μm の PVDF 膜でろ過した。以下、(a) と同様。
- (g) ろ過前液及びろ液に含まれる PrP^{Sc} のバンド強度を定量し、脳組織当量で補正した後、RF (Reduction Factor、RF = log₁₀ [ろ過前液の PrP^{Sc} 量 / ろ液の PrP^{Sc} 量]) を算出した。同様の実験を 1 又は 2 回行って求めた RF。

異常型プリオンの処理方法の能力評価に関する試験研究

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 主任研究官

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入するおそれがある異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の検出法及び製造工程での除去技術の開発が望まれている。製造原材料の品質確保及び種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc} 検出法の開発に資する基礎研究として、蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP^{Res}) を産生する、継代を重ねた後に長期間培養したヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G が発現する mRNA の解析を行った。

T98G 細胞は、プリオン蛋白質 (PrP) の C 末端と GPI アンカーシグナル配列を欠損したスプライス変異型 PrP mRNA を発現し、その発現量は継代を重ねるとともに上昇した。しかし、スプライス変異型 PrP mRNA の発現量は低く、PrP mRNA 発現量の 0.002 ~ 0.004 % であった。次いで、スプライス変異型 PrP の C 末端を認識するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により蛋白質の確認を行った結果、一部の細胞において核への局在が示唆された。

A. 研究目的

ヒトのプリオン病には硬膜移植等によって発症する感染性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子 (*PRNP*) にコードされた 253 残基のアミノ酸に変異がある遺伝型 CJD 及び *PRNP* に変異のない散发型 CJD が知られ、約 85 ~ 90 % を散发型 CJD が占めている。また、1996 年に英国で発症が確認された変異型 CJD は、従来の CJD とは異なり、患者の異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の生化学的研究及び英国で多発していたウシ海綿状脳症 (BSE) に関する疫学研究の結果から、ウシ PrP^{Sc} のヒトへの伝達によって発症すると考えられている。

一方、細胞培養で産生される遺伝子組換え医薬品等には製造工程に血清等のウ

シ由来原料が用いられているものが多い。また、最近では、CJD 発症以前のドナーに由来する血液の輸血によって変異型 CJD が伝達されたと推測される症例が報告されている。血清等のウシ由来原料及び血液製剤の安全性を確保するため、原材料に混入するおそれがある PrP^{Sc} の検出法及び製造工程での除去技術の開発が望まれている。

PrP^{Sc} は正常プリオン蛋白質 (PrP^C) と同一のアミノ酸配列を有し、蛋白質分解酵素処理や熱に耐性を示すことから、原材料等への混入を高感度に検出する技術及び製造工程から有効に除去する技術はいまだに確立されていない。

本研究では、製造原材料の品質確保及び種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc} 検出法の開発に資する基礎研

究として、PrP^Cを高発現しているヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G を対象とし、継代を重ねた後に長期間培養してプロテナーゼ K (PK) 処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) を産生する条件下における PrP^{Sc} 産生様式の解析を行った。

平成 16 年度は、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型 PrP mRNA を T98G 細胞が発現することを確認し、その mRNA 配列から推定されるスプライス変異型 PrP の C 末端部位を認識するモノクローナル抗体を作製した。平成 17 年度は、スプライス変異型 PrP が TSE に果たす役割を明らかにするためにスプライス変異型 PrP mRNA の発現量が変化する条件を解析し、併せてスプライス変異型 PrP 蛋白質の同定を試みた。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G は T75 組織培養用フラスコで培養し、1 週間に 1 度の継代を行った。長期間の培養は 9 cm 組織培養用シャーレで行い、4 日ごとに培地を交換した。

2. 間接蛍光抗体法

9 cm 組織培養用シャーレ中のカバーガラス上に培養した T98G 細胞をホルマリンで固定後、第 1 抗体として抗 PrP モノクローナル抗体 6H4 及びスプライス変異型 PrP の C 末端に相当するペプチドを認識するモノクローナル抗体を、第 2 抗体として Alexa 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行い、PrP 及びスプライス変異型 PrP の細胞内分布を調べた。

3. リアルタイム定量 PCR

T98G 細胞を培養後、DNase I で消化した総 RNA を調製し、SuperScript III RNase H 逆転写酵素 (インビトロジェン社) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。これを PCR での鋳型 DNA として、PRNP (GenBank accession No. AL133396) のエキソン 2 にコードされている PrP オープンリーディングフレーム (ORF) の mRNA を検出するプライマー (図 1 上段) 及びハウスキープイング遺伝子である β -アクチンを検出するプライマー並びにそれぞれに対応した TaqMan プローブとともに FastStart TaqMan Probe Master (ロッシュ・ダイアグノスティックス社) を用いてマルチプレックス PCR を行った。PCR の結果に基づく定量は、Chromo 4 リアルタイム PCR 解析システム (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社) を用いて相対定量法により実施した。

4. 蛋白質分解酵素消化

T98G 細胞の全細胞抽出液を PK で消化 (10 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 30 分間) した後、イムノブロット法 (5 参照) により PrP の蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

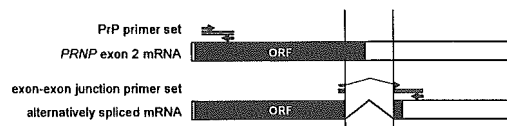


図 1 Schematic representation of quantitative RT-PCR primer sets

The arrowed regions represent the primer sets, and the doublets represent the expected products.

5. イムノブロット法

試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜へ転写し、第 1 抗体と第 2 抗体にそれぞれマウス抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4 (IgG、Kikuchi, Y., *et al. J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004)) 及び西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いたイムノブロットを行い、化学発光法で PrP を検出した。

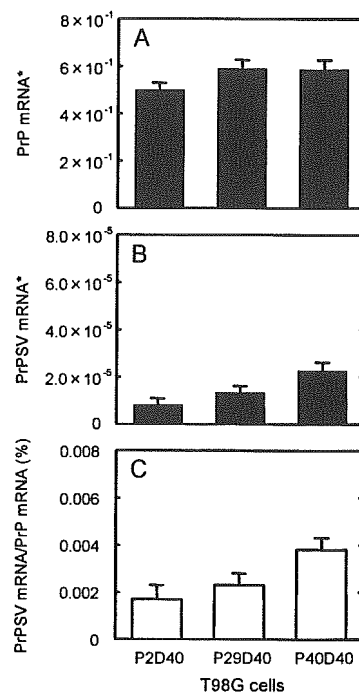
(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定、同病原体等安全管理規程及び同動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

PRNP がコードする mRNA の発現様式を調べるため、継代数が異なる T98G 細胞をさらに 40 日間培養した細胞から、それぞれ総 RNA を調製した。それらを鋳型として 1 本鎖 cDNA を合成し、PrP mRNA の検出に用いるプライマー (図 1 上段) 及びスプライス変異型 PrP mRNA の検出に用いる exon-exon junction プライマー (図 1 下段) 並びにそれぞれに対応した TaqMan プローブを用いてリアルタイム定量 PCR を行った。

T98G 細胞は PrP mRNA を高発現し、相対発現量が高い β -アクチン mRNA に比較して 50 % 以上の発現量を示している (図 2 A)。継代 2 回後に 40 日間培養した T98G 細胞 (P2D40) に比較して、継代 29 回後に 40 日間培養した細胞 (P29D40) では PrP mRNA の発現量が



* Relative expression were normalized to β -actin copy numbers.

図 2 Quantification of splice variant of PrP (PrPSV) mRNA in T98G cells

RNA were prepared from T98G cells for 40 days after 2 passages (P2D40), 29 passages (P29D40) and after 40 passages (P40D40). The resulting total RNA (5 μ g) were analyzed by real-time RT-PCR with PrP primer set and exon-exon junction primer set. The β -actin primer set was used as a control for the amount of RNA used in each reaction (panels A and B). Splice variant of PrP (PrPSV) mRNA (%) were shown as average relative expression values normalized to PrP mRNA (panel C). Values are the mean \pm standard error (SE) of three experiments.

増加し、継代 40 回後に 40 日間培養した細胞 (P40D40) でもほぼ同じ発現量を示した (図 2 A)。一方、スプライス変異型 PrP mRNA の発現量は低く、P2D40 では PrP mRNA の発現量の約 0.002 % 以下であった (図 2 C)。しかし、その発現量は継代数とともに増加し、P40D40 では P2D40 の 2.8 倍 ($p < 0.05$, 2 標本 t 検定) の値を示した (図 2 B)。

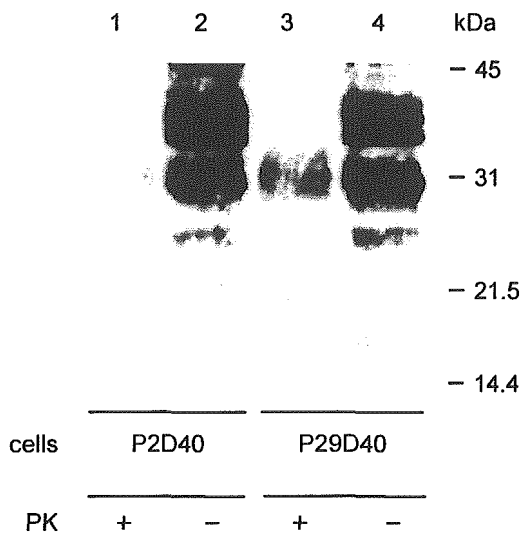


図3 Immunoblot analysis for the protease-resistant form of PrP (PrP^{res}) in T98G cells

T98G cells were incubated for 40 days after 2 passages (P2D40) and 40 passages (P29D40). Whole cell lysates (50 µg protein) were treated with PK (10 µg/mL) at 37 °C for 30 min (lanes 1 and 3) or left undigested (lanes 2 and 4). The PK-treated lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with the 6H4 antibody.

次に PrP を認識するマウスモノクローナル抗体 6H4 及びスプライス変異型 PrP の ORF から予想される 214 ~ 230 残基に相当するペプチドを認識するマウスモノクローナル抗体を用い、蛋白質の検出を試みた。

T98G 細胞を播種して 40 日後に全細胞抽出液を調製し、PK で消化後に免疫ブロットを行った。PK 未処理の P2D40 及び P29D40 の全細胞抽出液では、抗体 6H4 が認識する PrP に相当するバンドが 35 kDa、31 kDa 及び 25 kDa の位置にみられた (図 3 レーン 2 及び 4)。PK 処理によって、P2D40 では全てのバンドが消失したが (図 3 レーン 1)、P29D40 では 31 kDa の位置に PK 処理抵抗性の PrP^{res} に相当するバンドがみられた (図 3

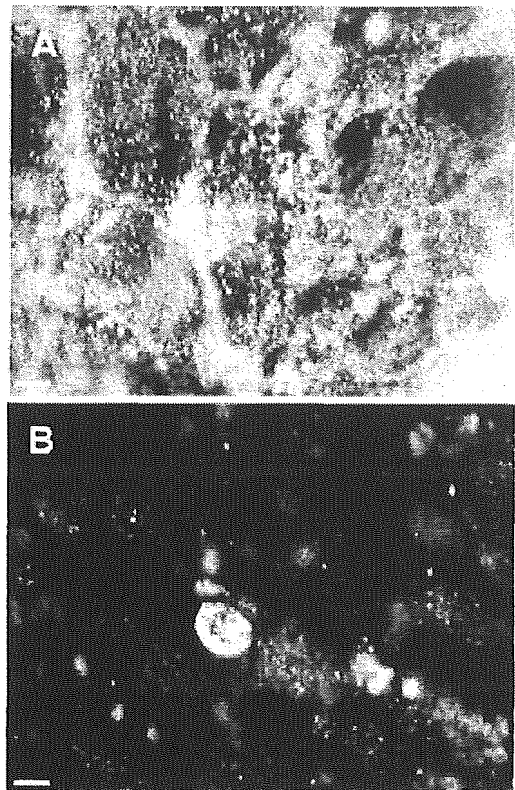


図4 Subcellular localization of PrP and splice variant isoform of PrP (PrPSV) in long-term cultured T98G cells

T98G cells were incubated for 80 days after 40 passages. T98G cells on a 15 mm glass coverslip were subjected to indirect immunofluorescence staining with the 6H4 (A) and HPSV7 (B) antibodies. Scale bars, 10 µm.

ン 3)。また、図には示していないが、P40D40 も P29D40 と同様な PK 反応性を示した。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端に相当するペプチドを認識する 7 種類のモノクローナル抗体を用いて免疫ブロットを行った場合には、PrP に相当するバンドを検出できなかった。

次に、間接蛍光抗体法によりスプライス変異型 PrP の検出を行った。継代 40 回後に 80 日間培養した T98G 細胞 (P40D80) を用い、PrP を認識する抗体 6H4 で間接蛍光抗体法を行ったところ、PrP はほとんどの細胞でその細胞膜上に

分布し、細胞質及び核内には認められなかった (図 4 A)。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端に相当するペプチドを認識する 7 種類のモノクローナル抗体を用いた場合には、このうち 3 種類の抗体において、一部の細胞で核に特異的に局在する蛍光を示した (図 4 B)。図には示していないが、コントロールとして非特異的なマウス IgG 抗体を用いた場合には、そのような蛍光は示さなかった。

D. 考察

ヒトグリオーマ細胞株 T98G は、継代を重ねた後に長期間培養すると PK 処理抵抗性の PrP^{Sc} を産生する (Kikuchi, Y., *et al. J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004))。さらに T98G 細胞は、PrP の C 末端部位と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型 PrP の mRNA も発現しており、その発現量は継代数が増えるに従い増加した。スプライス変異型 PrP mRNA の ORF は 230 アミノ酸をコードしており、1 ~ 217 残基までは PrP と同じ 1 次構造をもち、全体として PrP と 94 % の相同性を有している (図 5)。スプライス変異型 PrP mRNA の発現は T98G 細胞だけでなく、市販の各種ヒト臓器由来の総 RNA でも確認しており、この蛋白質を生体由来の医薬品原料に対する添加回収実験等に用いることを目的とし、PrP 及びスプライス変異型 PrP の C 末端を認識するモノクローナル抗体を用いて蛋白質の確認を試みた。PrP を認識する抗体 6H4 は、T98G 細胞が産生する PrP 及び PK 処理抵抗性の PrP^{Sc} をイムノブロットで認識した (図 3)。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端を認識する 7 種類のモノクローナル抗体では、予想される分子量の位置にバンドが認められなかった。リアルタイム定量 PCR で

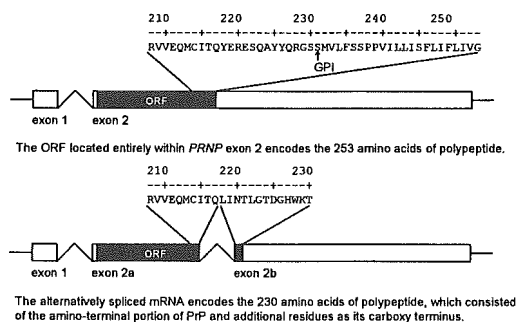


図 5 Schematic representation of the PRNP gene consisting exons 1 and 2

の測定によると、スプライス変異型 PrP mRNA は PrP mRNA の 0.002 ~ 0.004 % 程度しか発現していなかったことから、スプライス変異型 PrP 蛋白質の産生量は今回実施したイムノブロットの検出感度以下であった可能性がある。今後は、スプライス変異型 PrP 蛋白質を免疫沈降法等で濃縮した上でイムノブロットを実施することにより、イムノブロット法の検出感度を向上させることを試みる予定である。

抗体 6H4 を用いた間接蛍光抗体法では、T98G 細胞の細胞膜上に PrP が大量に発現していることが確認された。一方、スプライス変異型 PrP の C 末端を認識する抗体では、用いた 7 種類中 3 種類で核に局在する蛍光が一部の細胞で観察された (図 4)。非特異的なマウス抗体を同一の抗体濃度で用いた比較実験では同様な蛍光が認められなかったことから、スプライス変異型 PrP は一部の細胞で核に局在していることが推定された。正常 PrP は C 末端にある GPI アンカーシグナル配列で細胞膜上に結合しているが、その N 末端には核移行シグナルに類似したアミノ酸配列を有している。また、ヒトの遺伝型プリオン病でアルツハイマー病様の痴呆症状を呈した患者でみられたコドン 145 のストップ変異を有する PrP

遺伝子を発現させた培養細胞では、PrP が核内に移行することが報告されている (Zanusso, G., *et al.* *J. Biol. Chem.* 274: 23396-23404 (1999); Gua, Y., *et al.* *Neurobiol. Disease* 12: 133-149 (2003))。スプライス変異型 PrP mRNA の ORF から推定されるアミノ酸配列は 1 ~ 217 残基が PrP と同一で GPI アンカーシグナル配列をもたないことから、スプライス変異型 PrP は核に移行することが推定される。今回の結果ではスプライス変異型 PrP の核への局在が認められたが、その発現量は低く、かつ一部の細胞で観察されたのみであったことから、現時点ではスプライス変異型 PrP が核に移行するとは断言できない。今後は、他の培養細胞内でのスプライス変異型 PrP の大量発現、及び間接蛍光抗体法と併せて exon-exon junction プライマー (図 1) を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを実施し、スプライス変異型 PrP の核内への移行を確認する予定である。

E. 結論

平成 17 年度は、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型 PrP mRNA を T98G 細胞が発現し、継代を重ねた後に長期間培養すると発現量が増加することを確認した。スプライス変異型 PrP mRNA の発現量は PrP mRNA の 0.002 ~ 0.004 % であった。また、C 末端部位を認識する抗体を用いた間接免疫染色法によって、スプライス変異型 PrP 蛋白質の核への移行が推定された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

<平成 16 年>

- 1) Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., and Sawada, J. "Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G." *J. Gen. Virol.* 85: 3449-3457 (2004)

2. 学会発表

<平成 18 年>

- 1) 蜂須賀 暁子, 児矢野 聡, 菊池 裕, 中島 治, 青笹 正義, 松田 治男, 手島 玲子, 澤田純一. "抗マウスプリオンペプチドフェージ 1 本鎖抗体の作製." 日本薬学会第 126 年会 (28-30 Mar. 2006, 仙台)

<平成 17 年>

- 2) 菊池 裕, 中島 治, 酒井 綾子, 松田 治男, 山崎 壮, 棚元 憲一, 池田 喜久子, 山口 直人, 澤田 純一, 高鳥 浩介. "ヒトグリオブラストーマ T98G 細胞株が発現するスプライシング変異プリオン蛋白質遺伝子のヒト組織中での検出." 第 78 回日本生化学会大会 (19-22 Oct. 2005, 神戸)
- 3) Sakai, A., Kikuchi, Y., and Takatori, K. "Differentially expressed genes in BALB/3T3 cells with exposure to non-genotoxic chemicals which promote cell transformation." 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (21-25 Aug. 2005, Berlin, Germany)

<平成 16 年>

- 4) Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto,

K., Ikeda, K., Yamaguchi, N., Sawada, J., and Takatori, K. "Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)

- 5) 菊池 裕, 掛谷 知志, 酒井 綾子, 松田 治男, 山崎 壮, 棚元 憲一, 池田 喜久子, 山口直人, 澤田純一, 高鳥浩介. "低酸素濃度下で培養したヒトグリオブラストーマ T98G 細胞株のスプライシング変異プリオン蛋白

質遺伝子の発現." 第 77 回日本生化学会大会 (13-16 Oct. 2004, 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

本年度は該当なし。

2. 実用新案登録

本年度は該当なし。

3. その他

本年度は該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

<書籍>

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ

<雑誌>

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
平成 17 年					
Hidefumi Furuoka, Atushi Yabuzoe, Motohiro Horiuchi, Yuichi Tagawa, Takashi Yokoyama, Yoshio Yamakawa, Morikazu Shinagawa, and Tetsutaro Sata	Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals	<i>Acta Neuropathologica</i>	109 (3)	263-271	2005
Osamu Inanami, Shukichi Hashida, Daisuke Iizuka, Motohiro Horiuchi, Wakako Hiraoka, Yuhei Shimoyama, Hideo Nakamura, Fuyuhiko Inagaki, and Mikinori Kuwabara	Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	335 (3)	785-792	2005
Akiko Iwata, Teruhide Yamaguchi, Kouei Sato, Noriko Yoshitake, and Akio Tomoda	Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4 α -dihydro-4 α -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one	<i>Biological & Pharmaceutical Bulletin</i>	28 (5)	905-907	2005
Yukio Yamamoto, Yoshiko Akita, Shigeyuki Tai, Susumu Fukasaku, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Oshizawa, Kazuko Yamaoka, Mariko Shimamura, and Tadahiko Hazato	Two-dimensional electrophoresis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis	<i>Journal of Electrophoresis</i>	49 (1)	23-27	2005
Yasuhisa Kurosaki, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa	Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i>	67 (3)	321-323	2005

Natsumi Kataoka, Masakazu Nishimura, Motohiro Horiuchi, and Naotaka Ishiguro	Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, <i>Cervus nippon</i> , from Tokachi district in Hokkaido	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i>	67 (3)	349-351	2005
堀内 基広	BSE 診断法の開発と現状	<i>Virus Report</i>	2 (1)	20-27	2005
堀内 基広	人獣共通感染症としてのプリオン病	ウイルス	55 (1)	45-55	2005
水沢 左衛子, 岡田 義昭, 堀内 善信, 田中 建志, 佐藤 功栄, 金子 健二, 佐々木 祐子, 田中 利明, 伴野 丞計, 友水 健雄, 速水 照一, 土方 美奈子, 平子 一郎, 真弓 忠, 三上 貢一, 三代 俊治, 宮本 誠二, 牟田 健吾, Thomas Weimer, Todd Gieman, 小室 勝利, 山口 照英	C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製	日本輸血学会雑誌	51 (5)	515-519	2005
堀内 基広	動物由来感染症としてのプリオン病	日本臨牀	63 (12)	2213-2220	2005
堀内 基広	異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達	膜	30 (2)	78-83	2005
平成 16 年					
Yutaka Kikuchi, Tomoshi Kakeya, Ayako Sakai, Kosuke Takatori, Naoto Nakamura, Haruo Matsuda, Takeshi Yamazaki, Ken-ichi Tanamoto, and Jun-ichi Sawada	Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G	<i>Journal of General Virology</i>	85 (11)	3449-3457	2004
Chan-Lan Kim, Ayako Karino, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, Motoyoshi Sato, and Motohiro Horiuchi	Cell-surface retention of PrP ^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation	<i>Journal of General Virology</i>	85 (11)	3473-3482	2004
Altagerel Gombojav, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa	Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i>	66 (10)	1293-1295	2004
Chan-Lan Kim, Atsushi Umetani, Toshio Matsui, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, and Motohiro Horiuchi	Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies	<i>Virology</i>	320 (1)	40-51	2004

研究成果の刊行物・別刷

- 1) Hidefumi Furuoka, Atushi Yabuzoe, Motohiro Horiuchi, Yuichi Tagawa, Takashi Yokoyama, Yoshio Yamakawa, Morikazu Shinagawa, and Tetsutaro Sata. "Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals." *Acta Neuropathologica* 109(3): 263-271 (2005) 75
- 2) Osamu Inanami, Shukichi Hashida, Daisuke Iizuka, Motohiro Horiuchi, Wakako Hiraoka, Yuhei Shimoyama, Hideo Nakamura, Fuyuhiko Inagaki, and Mikinori Kuwabara. "Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335(3): 785-792 (2005) 84
- 3) Akiko Iwata, Teruhide Yamaguchi, Kouei Sato, Noriko Yoshitake, and Akio Tomoda. "Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4 α -dihydro-4 α -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28(5): 905-907 (2005) 92
- 4) Yukio Yamamoto, Yoshiko Akita, Shigeyuki Tai, Susumu Fukasaku, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Oshizawa, Kazuko Yamaoka, Mariko Shimamura, and Tadahiko Hazato. "Two-dimensional electrophoresis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis." *Journal of Electrophoresis* 49(1): 23-27 (2005) · 95
- 5) Yasuhisa Kurosaki, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa. "Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan." *Journal of Veterinary Medical Science* 67(3): 321-323 (2005) 100
- 6) Natsumi Kataoka, Masakazu Nishimura, Motohiro Horiuchi, and Naotaka Ishiguro. "Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido." *Journal of Veterinary Medical Science* 67(3): 349-351 (2005) 103
- 7) 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と現状." *Virus Report* 2(1): 20-27 (2005) 106
- 8) 堀内 基広. "人獣共通感染症としてのプリオン病." *ウイルス* 55(1): 45-55 (2005) ...
..... 114
- 9) 水沢 左衛子, 岡田 義昭, 堀内 善信, 田中 建志, 佐藤 功栄, 金子 健二, 佐々木 祐子, 田中 利明, 伴野 丞計, 友水 健雄, 速水 照一, 土方 美奈子, 平子 一郎, 真弓 忠, 三上 貢一, 三代 俊治, 宮本 誠二, 牟田 健吾, Thomas Weimer, Todd Gierman, 小室 勝利, 山口 照英. "C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製." *日本輸血学会雑誌* 51(5): 515-519 (2005) 121
- 10) 堀内 基広. "動物由来感染症としてのプリオン病." *日本臨牀* 63(12): 2213-2220 (2005) 126
- 11) 堀内 基広. "異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達." *膜* 30(2): 78-83 (2005) ... 133

Hidefumi Furuoka · Atushi Yabuzoe · Motohiro Horiuchi
Yuichi Tagawa · Takashi Yokoyama
Yoshio Yamakawa · Morikazu Shinagawa
Tetsutaro Sata

Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals

Received: 12 July 2004 / Revised: 12 October 2004 / Accepted: 12 October 2004 / Published online: 22 December 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract For immunohistochemistry of the prion diseases, several pretreatment methods to enhance the immunoreactivity of human and animal abnormal proteinase-resistant prion protein (PrP^{Sc}) on the tissue sections have been employed. The method of 121°C hydrated autoclaving pretreatment or the combination method of 121°C hydrated autoclaving with a certain chemical reagent (formic acid or proteinase K, etc) are now widely used. We found that an improved hydrated autoclaving method at 135°C, more effectively enhanced PrP^{Sc} immunoreactivity for the antibodies recognizing the linear epitope. In addition, this method was more effective for the long-term fixation samples as compared with other previous methods. However, this modified method could not retrieve PrP^{Sc} antigenic epitopes

composed of conformational structures or several discontinuous epitopes. We describe the comparative studies between our improved method and other antigen-retrieval procedures reported previously. Based on the differences of reaction among the antibodies, we also discuss the mechanisms of the hydrated autoclaving methods to retrieve PrP^{Sc} immunoreactivity.

Keywords Prion protein · Immunohistochemistry · Antigen retrieval · Autoclaving · Monoclonal antibody

H. Furuoka (✉) · A. Yabuzoe
Department of Pathobiological Science,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
080-8555 Obihiro, Japan
E-mail: furuoka@obihiro.ac.jp
Fax: +81-155-495364

M. Horiuchi
Department of Applied Veterinary Science,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
080-8555 Obihiro, Japan

M. Horiuchi
Research Center for Protozoan Diseases,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
080-8555 Obihiro, Japan

Y. Tagawa · T. Yokoyama · M. Shinagawa
Prion Disease Research Center,
National Institute of Animal Health,
305-0856 Ibaraki, Japan

Y. Yamakawa
Department of Biochemistry and Cell Biology,
National Institute of Infectious Diseases,
162-8640 Tokyo, Japan

T. Sata
Department of Pathology,
National Institute of Infectious Diseases,
162-8640 Tokyo, Japan

Introduction

Scrapie in sheep and goat, bovine spongiform encephalopathy (BSE), chronic wasting disease in deer and Creutzfeldt-Jakob disease (sporadic, iatrogenic, familial and variant forms) and Kuru in humans are transmissible neurodegenerative disorders belonging to a group of prion diseases. They are characterized by the accumulation of abnormal proteinase-resistant prion protein (PrP^{Sc}), which is an isoform of the cellular, proteinase-sensitive prion protein (PrP^C), as a result of post-translational modification with increases of the population of β -sheet conformation in the brain [20]. The pathology is characterized by neuronal cell loss, spongiform change, gliosis and deposition of abnormal amyloid protein.

Immunohistochemistry to demonstrate PrP^{Sc} in tissue sections is now a well-established technique for the diagnosis of prion diseases [2]. It has been reported that PrP^{Sc} immunoreactivity is enhanced by several antigen-retrieval procedures such as formic acid [4, 10], a combination of formic acid pretreatment and microwave processing [7, 14], hydrated or hydrolytic autoclaving [6, 11], guanidine thiocyanate [4, 19], and combined protocols [1, 8, 9, 15].

The recent disclosure of BSE in Japan has started an active surveillance for all slaughter cattle since October 2001. Briefly, diagnostic procedure is follows: samples

have been taken from the medulla oblongata (obex region) and examined by ELISA as the primary screening test; the ELISA-positive samples have then been confirmed by Western blot and/or immunohistochemistry. In starting an active surveillance for BSE in Japan, we applied various pretreatment methods for different antibodies to formalin-fixed and paraffin-embedded tissues to enhance PrP^{Sc} immunoreactivity. Although the pretreatment methods reported previously were found to retrieve PrP^{Sc} for antibodies used in this study, we found that an improved hydrated autoclaving method at 135°C more effectively enhanced PrP^{Sc} immunoreactivity for the antibodies recognizing the linear epitope. However, our modified method could not retrieve PrP^{Sc} antigens well for the monoclonal antibodies recognizing the conformational structures.

Here we describe the comparative studies between our improved method and other antigen-retrieval procedures reported previously, and discuss the mechanisms of the hydrated autoclaving methods to retrieve PrP^{Sc} immunoreactivity.

Materials and methods

Samples

We used the brain tissues that were cut coronally at the level including hippocampus and thalamus from two scrapie-infected and two negative control ICR mice, the medulla oblongata at the level of the obex, and the spinal cord from three scrapie-affected and two negative control sheep, and from three BSE-affected cattle in Japan and two control cattle. Two mice were inoculated intracerebrally with scrapie G1 strain, which induces amyloid plaque formations in the brain. Affected or non-affected sheep and cattle were diagnosed and confirmed by histological, immunohistochemical, and Western blot methods. These samples were fixed in 15% formalin for 48–72 h and embedded routinely in paraffin. BSE tissue blocks were treated with 98% formic acid for 1 h to reduce the infectivity of prion after formalin fixation. In

addition, we prepared the serial tissue blocks from the medulla oblongata of scrapie-affected sheep, which was immersed in 15% formalin at least for 6 months.

Immunohistochemistry

Serial tissue sections, 4 µm in thickness, were picked up on silane-coated glass slides (Muto Purechemicals Co., Japan). After deparaffinization, endogenous peroxidase was blocked by incubation in 3% H₂O₂ for 5 min. We applied six different pretreatment protocols as follows: (1) 98% formic acid for 5 min (designated as FA); (2) hydrated autoclaving at 121°C, 2 atmosphere (atm) for 20 min (with Tomy high-pressure steam sterilizer KS-323, Japan) in distilled water (121DWHA); (3) 121DWHA and 98% formic acid for 5 min (121DWHA/FA); (4) 121DWHA and proteinase K (0.4 mg/ml, Dako, USA) treatment for 1 min (121DWHA/PK); (5) hydrated autoclaving at 135°C, 3 atm for 20 min in distilled water (135DWHA); (6) 135DWHA and 98% formic acid for 5 min (135DWHA/FA). After applying each pretreatment, tissue sections were incubated with 10% goat or horse normal serum (Nichirei, Japan) for 30 min. In this study, we used the avidin-biotin complex methods (ABC kit; Vector Lab., USA) and the horseradish peroxidase-labeled polymer methods (Envision+ kit; Dako). Sections were exposed to primary antibodies for overnight at 4°C or 1 h at room temperature for ABC kit or Envision+ kit, respectively. As negative controls, the sections were exposed for each primary antibody without any pretreatments. The following steps were performed with second antibodies and others according to the each manufacturer's instructions. The signals were detected using diaminobenzidine (Simple stain DAB; Nichirei, Japan). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

The characteristics of the nine primary antibodies used in this study are summarized in Table 1. For sections prepared from the tissue blocks immersed in 15% formalin for 6 months, we tested the 121DWHA and 135DWHA methods using B103 and 43C5 antibodies.

Table 1 Characteristics of the nine antibodies used in this study (L linear epitope, DC discontinuous epitope, mAb monoclonal antibody, pAb polyclonal antibody)

Antibodies	Epitope		Clonality	Dilution	Immunogen	Source
	Position	L/DC				
132	119–127	L	mAb	1:200	Mouse recPrP	Horiuchi
149	147–153	L	mAb	1:500	Mouse recPrP	Horiuchi
43C5	163–169	L	mAb	1:10000	Mouse recPrP	Horiuchi
B103	103–121	L	pAb	1:1000	Cow recPrP	Horiuchi
6H4	155–163	L	mAb	1:500	Cow recPrP	Prionics (Zürich, Switzerland)
72	89–231(143–151)	DC	mAb	1:500	Mouse recPrP	Horiuchi
44B1	155–231	DC	mAb	1:200	Mouse recPrP	Horiuchi
44B2	155–231	DC	mAb	1:200	Mouse recPrP	Horiuchi
T2	Unknown	DC	mAb	1:500	Mouse recPrP	Tagawa

Morphometry

Serial sections from BSE-affected samples were pretreated with 121DWHA, 121DWHA/FA, 121DWHA/PK, 135DWHA, and 135DWHA/FA methods, and immunostained with four antibodies (B103, 43C5, 44B1, and 6H4), respectively. Each of the pretreatment conditions were evaluated on the selected five areas (total μm^2). The Lumina Vision computer analysis system (Mitani Corp., Tokyo, Japan) was used to measure the positive area of PrP immunostaining. The brown-colored chromogen precipitate was selected, digitized images of these areas, and the digital pixels converted into the density area (μm^2) on the software. The highest density measurement was set to 100% and relative density (RD) of immunostaining by the other pretreatments in the same area was calculated.

Results

Histopathology

In the mouse, neuropil vacuolation associated with astrogliosis and microglial proliferation was observed throughout all areas of the brain. Amyloid plaque structures were also seen, which were often observed in contact with the capillary vessels.

In the obex region of scrapie-infected sheep, neuropil vacuolation and single or multiple intracytoplasmic vacuoles were particularly found in the dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMNV), gracile nucleus, nucleus ambiguus and reticular formation [22]. The hypoglossal nucleus, olivary nucleus and nucleus of solitary tract (NST) were only mildly affected. In addition, spongiform

Table 2 Results of the immunoreactivity for the antibodies under pretreatment methods [FA 96% formic acid for 5 min, 121DWHA hydrated autoclaving at 121°C, 2 atmosphere (atm) for 20 min in distilled water, 121DWHA/FA 121DWHA and 96% formic acid for 5 min, 121DWHA/PK 121DWHA and proteinase K treatment for 1 min, 135DWHA hydrated autoclaving at 135°C, 3 atm for

20 min in distilled water, 135DWHA/FA 135DWHA and 98% formic acid for 5 min, M scrapie-affected mouse, C BSE-affected cow, S scrapie-affected sheep, P plaque type, D diffuse type, 3+ strongly positive signal, 2+ moderately positive signal, + faint positive signal, - negative]

Antibodies	Tissue source	Pretreatment					
		FA	121DWHA	121DWHA/FA	121DWHA/PK	135DWHA	135DWHA/FA
132	M/P	-	2+	2+	+	2+	2+
	M/D	-	+	2+	-	+	2+
	C	-	-	+	-	3+	3+
	S	-	-	2+	-	2+	3+
149	M/P	2+	+	2+	2+	3+	2+
	M/D	+	+	2+	+	3+	+
	C	-	-	2+	-	+	3+
	S	-	+	2+	2+	2+	3+
43C5	M/P	+	2+	2+	2+	3+	3+
	M/D	-	2+	2+	2+	2+	2+
	C	-	2+	2+	2+	2+	3+
	S	-	2+	2+	2+	3+	3+
B103	M/P	-	+	2+	2+	3+	3+
	M/D	-	+	2+	2+	3+	3+
	C	-	+	2+	2+	3+	3+
	S	-	+	2+	2+	3+	3+
6H4	M/D	-	+	2+	+	-	-
	M/P	-	+	2+	-	-	-
	C	-	+	2+	-	-	-
	S	-	+	2+	-	-	-
72	M/P	2+	+	3+	-	-	2+
	M/D	-	-	+	-	-	-
	C	+	-	2+	+	-	-
	S	-	+	2+	-	-	-
44B1	M/P	+	+	2+	-	+	2+
	M/D	-	-	2+	-	-	2+
	C	+	+	2+	-	-	+
	S	-	-	2+	-	-	+
44B2	M/P	+	+	3+	-	-	2+
	M/D	-	-	2+	-	-	+
	C	-	-	2+	-	-	-
	S	-	-	2+	-	-	-
T2	M/P	2+	+	3+	-	-	+
	M/D	-	-	2+	-	-	-
	C	-	-	2+	-	-	+
	S	-	-	2+	-	-	-

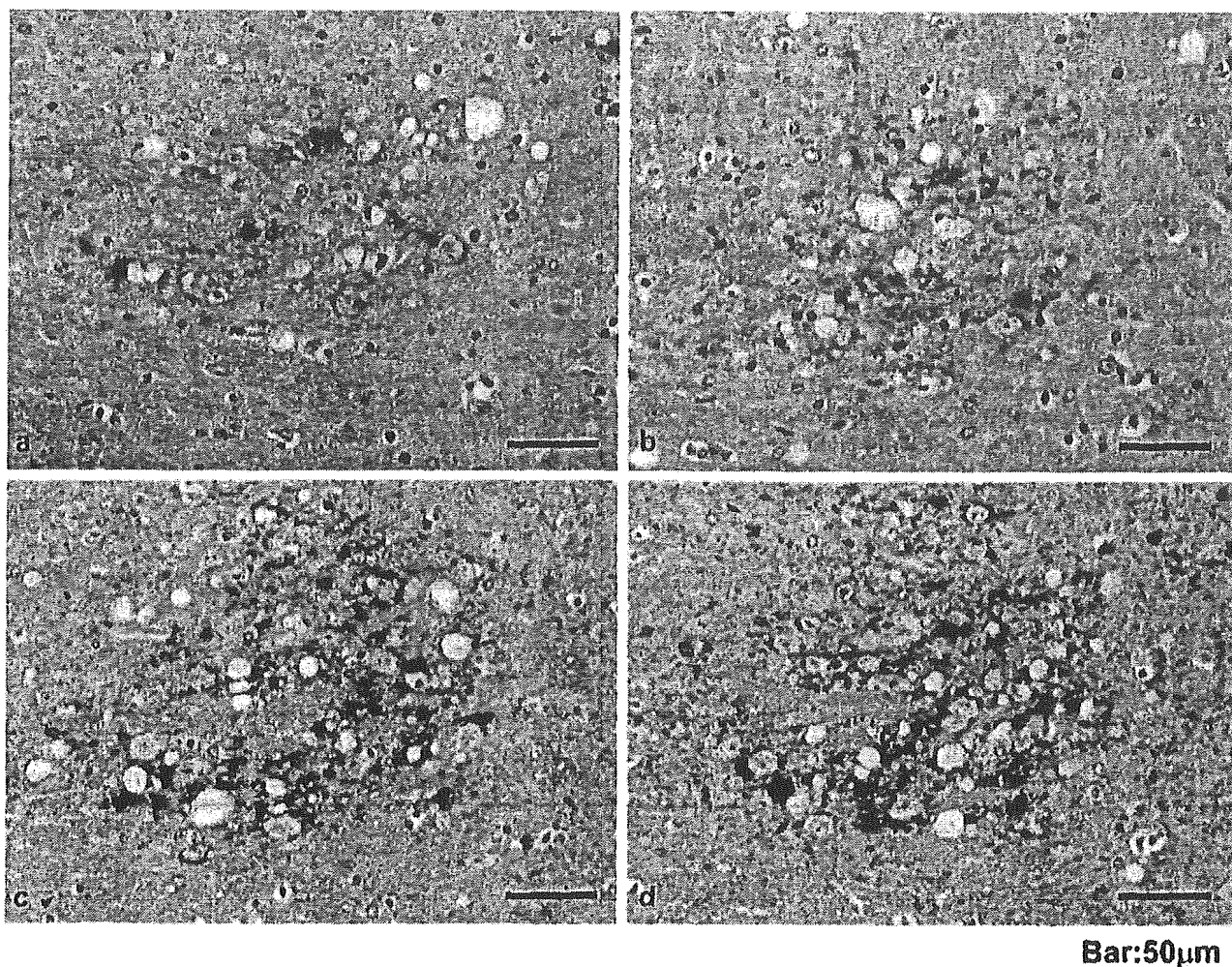


Fig. 1 Immunohistochemistry of the PrP with mAb 43C5 in the thalamus of scrapie-affected mouse; a 121DWHA, b 121DWHA/FA, c 135DWHA and d 135DWHA/FA methods. The immunodensity is considerably greater using the 135DWHA and 135DWHA/FA methods [PrP prion protein, 121DWHA hydrated autoclaving at 121°C, 2 atmosphere (atm) for 20 min in distilled water, 121DWHA/FA 121DWHA and 96% formic acid for 5 min, 135DWHA hydrated autoclaving at 135°C, 3 atm for 20 min in distilled water, 135DWHA/FA 135DWHA and 98% formic acid for 5 min]. Bars a-d 50 µm

neuropil lesions were seen in the periphery of the dorsal column of spinal cord and the vertebral column.

In BSE cases, because of the subclinical case, extremely mild spongiform lesions were observed only in the DMNV, and periphery of the reticular formation [24].

Immunohistochemistry

Immunohistochemical examination revealed that no PrP depositions were observed in the sections from the affected animals without pretreatment and from the control animals with and without pretreatment.

PrP^{Sc} immunostaining yielded characteristic patterns in each animals affected with prion disease [21]. The following immunostaining patterns were observed: (1) fine particulate deposition; (2) coarse particulate deposition; (3) perineuronal deposition; (4) glial type deposition; (5) perivascular or perivacuolar deposition; (6) plaque or plaque-like deposition.

In scrapie-infected mice, PrP^{Sc} deposits were observed diffusely in cortex, thalamus, and hippocampus. Perivascular, perivacuolar PrP^{Sc} deposits and plaque or plaque-like structures in thalamus were also seen.

The PrP^{Sc} deposits in scrapie-affected sheep were most intense in the DMNV. The hypoglossal nucleus also showed deposits, but the staining was sparse. Glial, coarse particulate, perineuronal, perivascular and perivacuolar depositions were found in the reticular formation.

In BSE cases, the intense positive reactions of PrP^{Sc} were observed in the DMNV, NST and periphery of the reticular formation, which showed fine, perineuronal and perivacuolar patterns. Fine or coarse particulate depositions were seen in olivary nucleus. The hypoglossal nucleus also showed positive reactions, but with a low intensity of immunostaining.

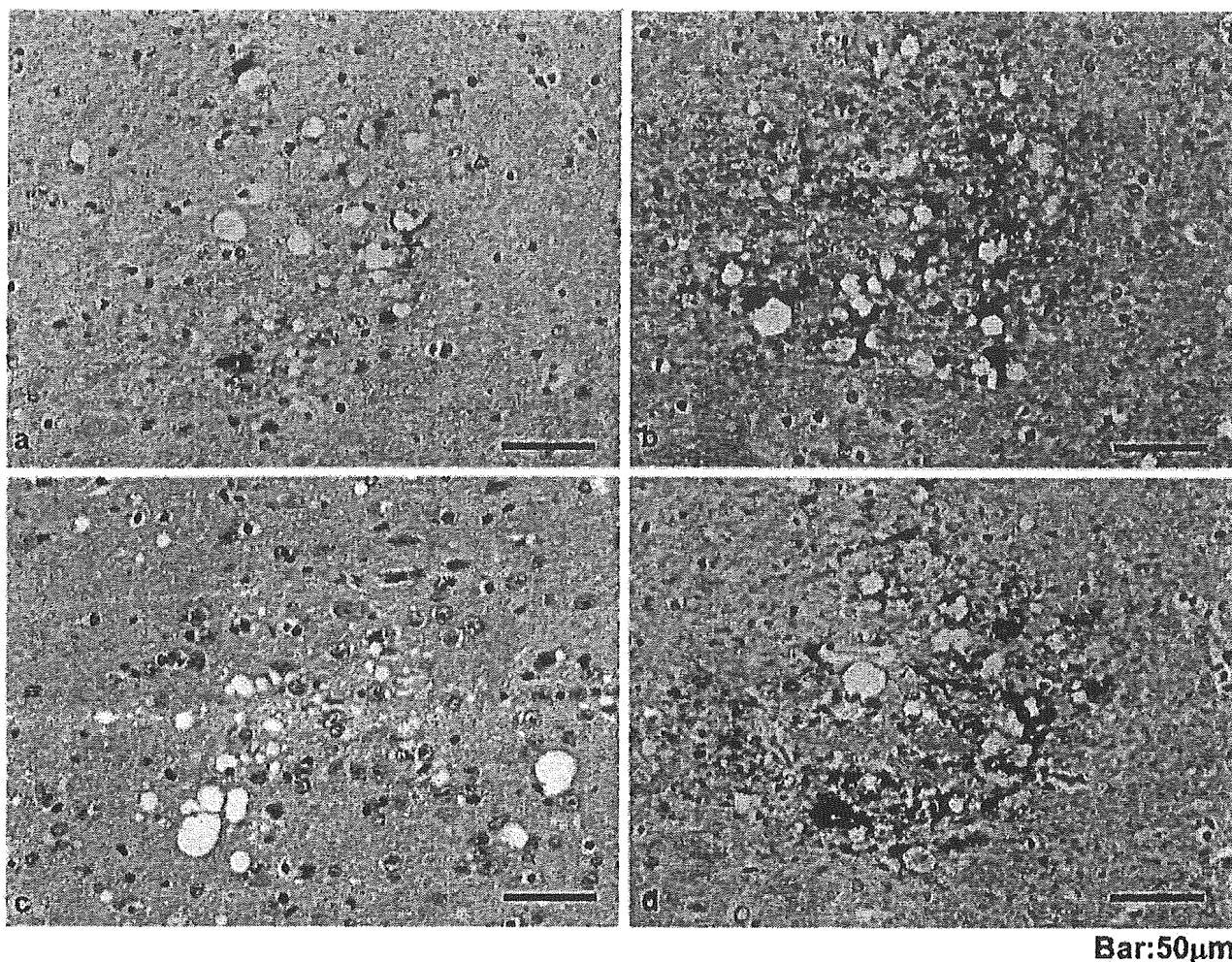


Fig. 2 Immunohistochemistry of the PrP with mAb 44B1 in the thalamus of scrapie-affected mouse; a 121DWHA, b 121DWHA/FA, c 135DWHA and d 135DWHA/FA methods. The 121DWHA/FA method is the most effective for enhancing the PrP and only faint reactivity is observed with the 121DWHA method. Although 135DWHA/FA method enhances the PrP, no reactive deposits are observed using the 135DWHA method. Bars a-d 50 µm

Comparison of pretreatment methods

Microscopic examinations for each pretreatment and antibody are summarized in Table 2. All antibodies used in this study reacted with PrP^{Sc} of all animals under some pretreatments.

Single FA pretreatment gave very weak or no reactions to all antibodies; however mouse amyloid plaques were positive to some antibodies (mAbs 149, 43C5, 72, 44B1, 44B2 and T2). Among 121DWHA, and a combination of 121DWHA with FA (121DWHA/FA) or PK (121DWHA/PK) pretreatments, 121DWHA/FA was most effective with most antibodies, but 121DWHA/PK was more or equally effective compared with 121DWHA/FA using mAb 43C5 and pAb B103. Considering the sensitivity to 135DWHA and 135DWHA/FA pretreatments, the antibodies used in

this study have been divided into two types, one which showed the increase in reactivity, and the other showing a significant reduction or a loss of reactivity. mAbs 132, 149, 43C5 and pAb B103, which reacted with the linear epitope, are classified to the former group (Fig. 1a-d), while mAbs 72, 44B1, 44B2 and T2 recognizing the discontinuous epitope are referred to the latter group (Fig. 2a-d). mAb 6H4 against cow recombinant PrP stained bovine, ovine and murine PrP^{Sc} with 121DWHA/FA pretreatment, but other pretreatments showed no positive reactions for any animal PrP^{Sc} except for the murine plaque type of PrP^{Sc} with 121DWHA, 121DWHA/FA and 121DWHA/PK pretreatments.

Effects on the sections from the tissues immersed in formalin for a long period

With 121DWHA and 135DWHA pretreatment, both B103 and 43C5 antibodies gave positive reactions in almost the same areas for sections of scrapie-affected sheep that had been immersed in formalin for

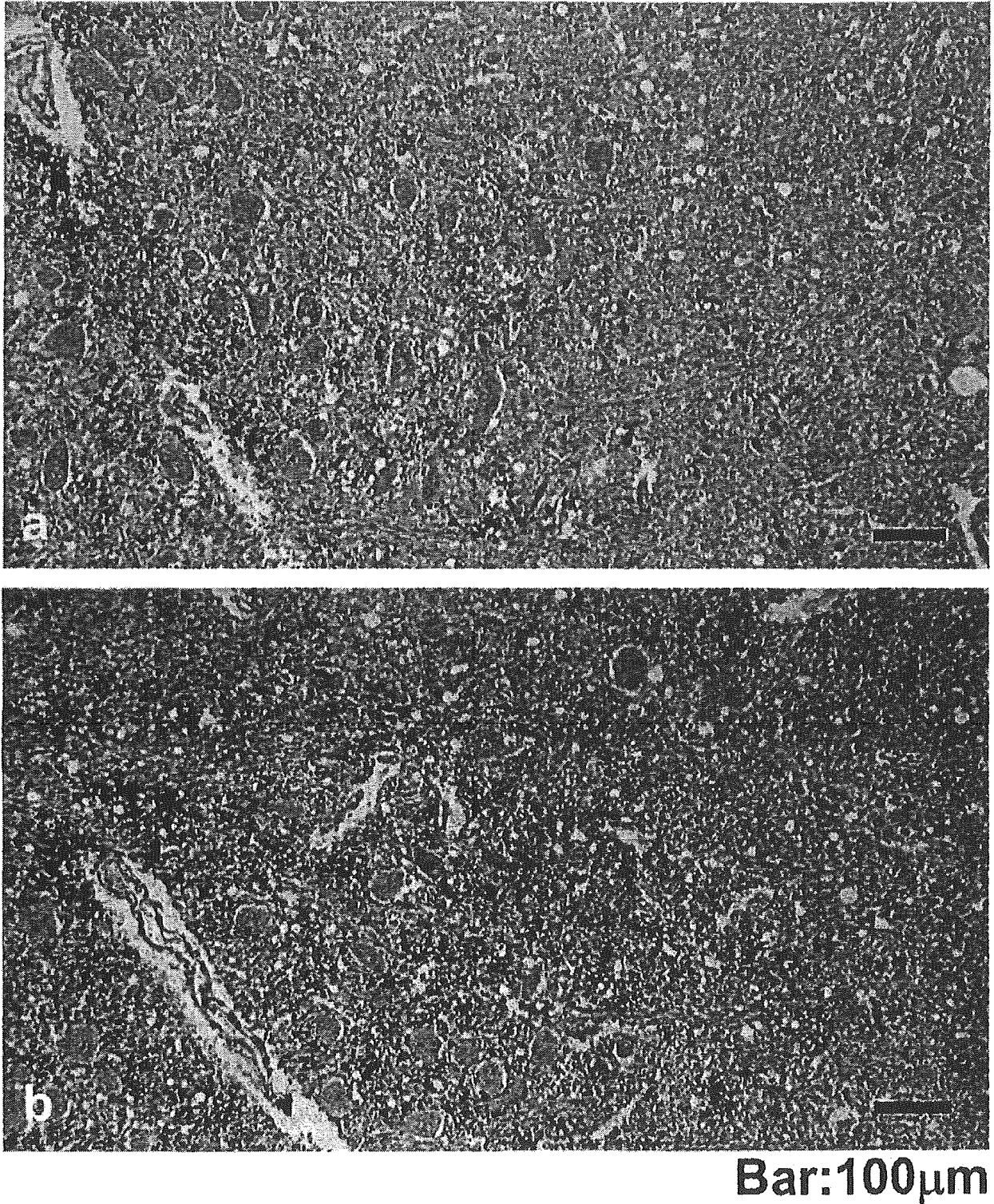


Fig. 3 Immunohistochemistry of the PrP with pAb B103 in the sections of scrapie-affected sheep from the sample immersed in formalin for 6 months; a 121DWHA and b 135DWHA methods. Bars a, b 500 µm

6 months. However, the sections treated by the 135DWHA method yielded an intense signal and widespread staining, while the detectable antigens in 121DWHA pretreatment were limited and showed low intensity (Fig. 3a, b).

Morphometry

The comparison of RD in each pretreatment method on BSE sections is shown in Fig. 4. This digital morphometry was in good agreement with the observations throughout. Although 135DWHA or 135DWHA/FA methods increased the density with mAb 43C5 and pAb B103, the effect was stronger with the former (Fig. 4a, b). Using mAbs 44B1 and 6H4, the 121DWHA/FA protocol was appropriate for antigen retrieval and the

135DWHA or 135DWHA/FA method were not effective (Fig. 4c, d).

Discussion

In immunohistochemistry for the prion diseases, several pretreatment methods to enhance the immunoreactivity of human and animal PrP^{Sc} on the tissue sections have been reported. The method of 121°C hydrated autoclaving pretreatment or the combination method of 121°C hydrated autoclaving with a certain chemical reagent (formic acid or proteinase K, etc) are now widely used [5, 13]. The precise mechanisms by which pretreatments enhance the PrP^{Sc} immunoreactivity are still unknown. However, the effect of these chemical treatments is considered to make amyloid fibril proteins denature, breaking down the structure of amyloid fibrils, and exposing the buried epitopes [4]. In formic acid pretreatment, microwave irradiation is thought to enable for formic acid penetration in tissue, and to expose the epitope and react with the antigen more efficiently [7]. In addition, it is speculated that hydrolytic autoclaving contributes to alter the primary structures of PrP in situ [11].

We describe a new hydrated autoclaving method, termed the 135DWHA method, to enhance the immunoreactivity of the PrP^{Sc}, and have compared this with the previously reported methods. Generally, the 135DWHA or 135DWHA/FA methods for the antibodies reacting with linear epitope showed a higher

Fig. 4 Comparison of relative density (RD%) using each pretreatment method on BSE sections for different antibodies; a pAb B103, b mAb 43C5, c mAb 6H4, and d mAb 44B1. mAb 44B1 recognizes discontinuous epitope, and others recognize linear epitope. The effect of FA, 121DWHA, 121DWHA/FA, 121DWHA/PK, 135DWHA and 135DWHA/FA is displayed as bar A, B, C, D, E and F, respectively. a FA displays 1 RD%, 121DWHA (29 RD%) does not lead to a significant increase. 121DWHA/FA and 121DWHA/PK show a density of 81 and 75 RD%, respectively. Immunodensity is further enhanced by 135DWHA (100 RD%) and 135DWHA/FA (100 RD%). b FA displays 1 RD%. 121DWHA, 121DWHA/FA and 121DWHA/PK show 15, 22 and 18 RD%, respectively. 135DWHA and 135DWHA/FA result in 100 and 94 RD%, showing a significant increase. c FA (5 RD%), 121DWHA (17 RD%), 121DWHA/PK (3 RD%), 135DWHA (1 RD%) and 135DWHA/FA (2 RD%) do not lead to a significant increase in immunodensity. 121DWHA/FA (100 RD%) shows the highest increase. d FA shows 22 RD% and 121DWHA 25 RD%. Immunodensity is not enhanced by 121DWHA/PK and 135DWHA. 135DWHA/FA displays 4 RD%. The best result was obtained by 121DWHA/FA (100 RD%) (FA 96% formic acid for 5 min, 121DWHA/PK 121DWHA and proteinase K treatment for 1 min)

