

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 18 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 員 名 簿

氏 名	所 属	職 名
佐多徹太郎	国立感染症研究所 感染病理部	部 長
松田潤一郎	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	室 長
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	上席研究員
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	上席研究員
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	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	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
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
月川由紀子	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 18 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	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作製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（国立感染症研究所・獣医科学部）	
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・プロテオーム解析	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質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. 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	35
分担研究者：古岡 秀文（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	41
分担研究者：石黒 直隆（岐阜大学応用生物科学部・食品環境衛生学教室）	
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	47
分担研究者：寺尾 恵治（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	55
分担研究者：扇 勉（北海道立畜産試験場・畜産工学部・生産病予防）	
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	59
分担研究者：堀内 基広（北海道大学大学院獣医学研究科）	
13. 綿山羊の伝達性海綿状脳症サーベイランスとヒツジ PrP 遺伝子型の分布	65
分担研究者：堀内 基広（北海道大学大学院獣医学研究科）	
14. プリオンの免疫系における増殖・伝播機構の研究	69
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	75
分担研究者：堂浦 克美（東北大学大学院医学系研究科・創生応用医学センター）	
16. 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	79
分担研究者：月川 由紀子（東京都芝浦食肉衛生検査所）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	93

# I. 総括研究報告書

平成 18 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 食品を介する BSE リスクの解明に関する研究として、本年度は、新しい病理・免疫組織化学法である ImmunoAT-tailing 法の oligo(dA-dT) 標識抗体の物性評価と調整法の標準化をおこなった。PET プロット法の改良が進んだ。小型全自動蛍光相関分光法測定装置で Q-dot を用いることでさらに感度増加が得られた。PMCA 法で非特異凝集体の形成阻害剤としてジギトニンを用いることにより BSE プリオンの増殖が可能となった。あらたな Tg マウスを樹立している。BSE プリオンのマウス伝達試験の結果、伝達に抵抗性のある動物ではヘテロなプリオンが混在していることが判明した。また種々の動物への伝達では初代と継代ではプリオンの体内分布が異なることがわかった。ウシ由来マクロファージがプリオンを取り込み分解し LPS 刺激で亢進した。Nuer2a における PrPC の細胞内代謝は膜結合型のプロテアーゼにより起こること、プリオン持続感染細胞では細胞密度により PrPSc 量が大きく増減することが判明した。プリオン病発症マウスの脳タンパク質のプロテオーム解析で PrPSc の蓄積に伴って神経軸索伸長制御因子 (CRMP-2) のプロセッシングがおこっているとの知見をえた。BSE プリオンの脳内接種牛は 13 頭で発症し、2 頭のサルでも発症し、プリオンの体内分布を明らかにした。と畜解体過程での枝肉の汚染状況を明らかにし洗浄法の SSOP モデルを提示し、また舌扁桃の除去法を明らかにした。わが国にはスクレイピーに遺伝的に感受性のあるヒツジが多いことがわかったが、めん羊のサーベイランスの結果はすべて陰性であった。169 ヶ月齢の非定型 BSE の特徴を明らかにし、動物伝達試験を開始した。

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 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）  
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）  
月川由紀子（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、世界で 24 ヶ国となった。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。2007 年 2 月までの約 5 年 4 ヶ月で 20 頭が摘発され、この中には 21 ヶ月の若齢牛や 23 ヶ月および 169 ヶ月の非定型例の発見があった。また死亡牛検査で計 12 頭の BSE 例

がみつきり、国内では計 32 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 162 例、フランス 21 例、ほか 14 例の計 197 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、非発症例ではあるがプリオン遺伝子の MV 型にも BSE プリオン沈着がみつかったことから、予想以上に人への感染が危惧され、わが国でも「食の安全」問題として BSE には国民の大きな関心が寄せられている。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多く、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、異常型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、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う。

本研究の柱は 5 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、4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究、そして 5) 佐世保非定型 BSE 例に関わる研究である。

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 ブロット法 (岡田) を応用する。スクリーニング検査には現在 ELISA 法が使われているが、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)。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 (萩原)、細胞特異性と細胞内分解機構 (堀内)、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、またこれらの評価系を確立する。さらにプリオンが沈着すると報告された舌扁桃の位置をわが国のと畜牛で明らかにする (月川)。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)。

5) 佐世保非定型 BSE 例に関わる研究：非定型 BSE 事例はまれであり、我が国の非定型 BSE の病態、病因の解析を行う (佐多、萩原、横山、堀内、古岡、扇、寺尾、石黒)。実験感染牛とは異なる所見が得られ、実際の BSE 例の発症機構の解明につながるデータが得られる可能性があり、我が国の BSE 対策のみならず、世界的な対策にも重要な科学的知見となる。

## 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 ブロット、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、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 MRI 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、ウェ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する。プリオンタンパク質の構造変換に関与する物質の解析を繰り返し、プリオン持続感染細胞で解析を発展させる。

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食肉における 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、と畜後の洗浄法を検討し、SSOP を提示する。と畜牛の舌を買い上げ、舌扁桃の位置を同定し、除去方法を検討する。

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。

5) 佐世保非定型 BSE 例に関わる研究: 生化学的性状解析、脳内および臓器内プリオン分布、動物への伝達性などの詳細な解析を行う。

(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) プリオンの高感度・迅速検査法: 新しい免疫組織化学検出法(ImmunoAT-tailing 法)に用いる oligo(dA-dT)標識抗体の物性評価と調整法の標準化をおこなった。この方法を用いた ELISA では、常法に比べ、Fab' -AT 標識抗体では 16 倍、IgG-AT 標識抗体を用いた場合は 32 倍の感度上昇が得られた。また oligo(dA-dT)の標識数を定量することができ、この方法のメドがたった。PET ブロット法を改良し、蛋白分解酵素処理を二段階の温度で行うこと、および C 末端領域を認識する抗体により、安定的かつ高感度となった。全自動蛍光相関分光法測定装置で ELISA と同等の感度を確認した。さらに Q-dot (半導体量子ドット)をプローブとして用いることによりさらに 5 倍の高感度化をはかることができた。PMCA 法の改良と最適化を継続している。本年度は増幅反応中に形成される PrP<sup>c</sup> の非特異凝集体形成がジギトニンを緩衝液に添加することで抑制され、増幅が可能となった。しかし BSE プリオンの増幅効率はいまだ十分とはいえなかった。マウスプリオン蛋白質のプロモーターを得て N2a 細胞でその活性を確認し、TG マウスを作成し、現在樹立している。

2) 牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構: BSE プリオンのマウス伝達実験の継代で潜伏期間が著明に短縮し、研究資源化を進めている。非定型 BSE-8 および若齢 BSE-9 では、現時点で伝達は成功していない。また TG マウスに伝達したプリオンの性状を解析すると BSE に類似した PrP<sup>Sc</sup> が検出された。伝達に抵抗性のある動物ではヘテロなプリオンが混在していた。各種プリオンの実験動物への伝達性および病態解析を実施している。BSE プリオンを接種したモルモットは早期に発症し感受性が高いことが明らかとなった。初代例ではリンパ系組織へのプリオンの沈着はみられなかったが、継代すると潜伏期の短縮とともに、リンパ系組織にも沈着するようになった。牛末梢単球と樹立したマクロファージではプリオンを高率に取りこみ分解することを見出した。また、LPS 刺激により分解能は亢進した。プリオン病発症マウスの脳タンパク質のプロテオーム解析で PrP<sup>Sc</sup> の蓄積に伴って神経軸索伸長制御因子



(CRMP-2)のプロセッシングが起きていることがわかった。B細胞、マクロファージに発現する細胞接着分子BILLカドヘリンを欠損したノックアウト・マウスでは、TSE発症遅延があることを明らかにした。また非神経系細胞でのプリオン増殖機構を検討するin vitro系構築のための種々の細胞株を樹立した。BSE脳内接種牛を解剖しプリオン体内分布を調べたところ、解剖した13頭すべての脳組織からPrPScを検出した。臨床症状出現前および発症期の牛では、PrPScは脳組織全域に分布した。末梢神経組織にもPrPScの蓄積があった。臨床症状出現6ヶ月前に脳幹部からプリオンが検出された。BSEプリオン接種後のサルは、接種後30ヶ月を経過した時点で行動異常、脳波異常が認められ、MRI像を撮影し、35-36ヶ月で2頭を剖検した。脳内に多くのプリオンが検出され、またvCJDにみられるFlorid plaqueと類似する所見をえた。バイオハザード型MRIコイル付き密封コンテナの開発を行った。Nucor2aにおけるPrPCの細胞内代謝は膜結合型のプロテアーゼにより起こること、およびプリオン持続感染細胞では細胞密度によりPrPSc量が大きく増減することが判明した。N2a細胞株を用いて異常型プリオン蛋白質の分解に関与する宿主因子、および異常型プリオン蛋白質産生やその阻害に関与する複数の宿主因子の遺伝子を明らかにした。プリオン蛋白と結合能を持ち酸化ストレスとも関係がある銅イオンとプリオン蛋白構造変換・シャペロンとの関係を解析し、シャペロンがヌクレオチド存在下で銅結合プリオン蛋白の部分構造をアンフォールドすることを見出した。

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: スチームバキューム工程は脳脊髄組織汚染除去に有効であること、高圧洗浄前のホース水による予備洗浄が枝肉の汚染除去及び高圧洗浄時の周辺環境の汚染防止に有効であることなどを考慮して標準的なSSOPを作製した。舌扁桃は舌の背面と側面の粘膜固有層内にあり、筋層内には認められなかった。最前位有郭乳頭から舌尖方向にも存在する場合があった。

4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究: ウェスタンブロット法を作成した。また現在まで826頭を検討したが、陰性であった。サ

フォーク種ヒツジの遺伝子型の割合は地域差があったが、感受性ヒツジは43-63%であった。

5) 佐世保非定型BSE例に関わる研究: 非定型BSEプリオンの糖鎖型について解析し、種々のマウス、牛、サルへの接種実験を開始した。脳内には斑状のアミロイド沈着が認められた。また、高齢牛ではPrPCの発現量は個体差が大きかったが、可溶性画分が減少していた。

## D. 考 察

1) 最新のBSE診断および検査技術に関する研究: 高感度免疫組織化学法の確立にむけた準備がほぼ整ったので、わが国のBSE例で感度の検討を行う予定である。安定し高感度なPETブロット法が確立でき、死後変化や凍結組織でも検出が可能であったので、有効な方法と考えられた。ほかFCCSやPMCA法等でも進歩がみられたが、せいぜい二桁程度であり、期待したほどの高感度化は得られていない。さらに工夫が必要であろう。

2) BSEリスクの解明に関する研究: 本年度はわが国のBSEプリオンを脳内接種した牛やサルの発症が観察され、体内分布が明らかにされた。また研究資源化も進み、ようやく種々のプリオン実験が行えるようになった。今後継代株が樹立されると本格的な実験も可能となる。In vitroの実験でも期待される研究結果が得られている。最終年度に向けて成果を出していきたい。

2007年1月15日時点で、わが国のBSE例の種々の動物への伝達試験結果を図にまとめた。いずれもBSEという確定診断がされたあと、そのプリオンの性状解析を目的として行われており、伝達試験の結果が陰性であっても、BSEの確定診断結果は変わらない。2001年9月の初発例(白井町)ほか、と畜牛12例の検体で行われた。佐世保例を1992年生まれのコホートとすると、1995-1996年コホートが7例、1999/2002年コホートが4例、そして判定保留とされた神奈川例の1例である。初発例については横山らにより3継代がすでに終了し株化が行われている。佐世保例は今年度から始まっているので、いまだ結果は得られていない。BSE-8の23ヶ月非定型例、BSE-9の21ヶ月若齢牛、そして判定保留の神奈川例については、

高い感度を示すトランスジェニックマウス (BoTgPrP, boTg39) の2継代でも発症はみられず、WB法でも脳や脾臓にプリオンは検出されていない。このマウスの系の検出感度については、横山らの報告でも述べられているように、 $10^{2.7}ID_{50}/g$ であることが判明し、これら3例の検体内プリオン量はそれ以下と考えられた。いずれも検体量に限りがある。それ以外では、

C57B6、RIII、SjL、ICR、I/LnJ といった系統マウスおよびトランスジェニックマウス、ウシ、サル等で伝達できたものがある。典型的 BSE 例でプリオン沈着量が多く、十分な検体が得られた 1995/1996年コホートでは伝達性が証明され、プリオンの性状解析が行われている。来年度までには研究論文として一部がまとめられるであろう。

我が国で摘発されたBSEの伝達試験のまとめ(平成19年1月15日現在)

	BSE	マウス	マウス(boTg)	ウシ	サル	その他
1992年コホート	#24 佐世保 非定型、老齢、肉用種	C57B6 RIII SjL ICR	TgboPrP(動物研) KiBoPrP(牛型PrP ノックインマウス 動物研)	ホルスタイン	カニクイ	ハタネズミ
伝達の有無		観察中	観察中	予定	予定	予定
1995/1996年コホート	#1-7	C57B6 RIII I/LnJ ICR	TgboPrP(動物研) boTg 39(homo, hetero感染研)	ホルスタイン (#5:神奈川 #6:和歌山)	カニクイ (# 6:和歌山)	
伝達の有無		成功	成功	成功	成功	
1995/2002年コホート	#8(茨城 23ヶ月、 非定型)		boTg 39 (homo, hetero) TgboPrP			
伝達の有無			不成功			
1999/2002年コホート	#9(福山 21ヶ月 若齢)		boTg 39(homo) TgboPrP			
伝達の有無			不成功			
1999/2002年コホート	#12熊本 #25岡山	C57B6, RIII SjL, ICR				ハタネズミ
伝達の有無		観察中				観察中
その他	保留例 神奈川 (2003.2.1)		boTg 39(homo) TgboPrP			
伝達の有無			不成功			

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：背割り工程で脳脊髄による枝肉への汚染が起こり、と畜場での作業量と作業員の人数等、枝肉の形状によって、汚染状況が異なっていた。背割り前の脊髄除去、スチームバキュームでの汚染除去、脊柱周囲を中心とする予備洗浄、そして自動高圧洗浄でかなりの汚染除去ができた。提示した SSOP モデルを各と畜場の状況に応じて作成し、継続的に GFAP のモニタリングを行い検証すべきであろう。舌扁桃は最後位から最前位有郭乳頭の間で 93.5% が存在し、外側面に多くみられた。舌扁桃は加齢とともに消失すると考えられた。確実に除去するには、舌隆起部先端から舌根部までの背面と側面について筋層が露出するような処理が必要である。

4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究：ヒツジやヤギにおけるサーベイランスの継続は必要である。またわが国のヒツジにはプリ

オン遺伝子の AQ/AQ をもつ感受性動物の割合が高いために、AR をもつ種畜の導入と計画的な交配が必要であろう。

5) 佐世保非定型 BSE 例に関わる研究：担当した食肉衛生検査所の協力を得て採材し、ウエスタンプロット法および病理免疫組織化学法でプリオンの分布と局在を明らかにし、イタリアの非定型例と類似していると考えられた。今後の伝達試験により詳細が明らかとなる。

## E. 結論

この研究班の課題である 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、4) めん羊等へのサーベイランスに関する研究、5) 佐世保非定型 BSE 例に関わる研究のそれぞれに於いて、食品を介する BSE リスクの解明に関わる研究の進捗がみられた。

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

なし

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 中島 典子 (感染研・感染病理部)

花木 賢一 (東大院・医・動物資源研究領域)

研究要旨 免疫組織化学 (IHC) の高感度化を目的とする immunoAT-tailing (IAT) 法の開発において、oligo (dA-dT) 標識抗体の物性評価と調製法の標準化を行った。F(ab')<sub>2</sub> を還元して oligo (dA-dT) を標識した Fab'-AT と IgG を還元して oligo (dA-dT) を標識した IgG-AT の粒径は、それぞれ平均 7.8 nm、11.2 nm (37°C) であった。また、それら oligo (dA-dT) 標識抗体を用いた IAT 法による ELISA では、常法を 1 とした場合、Fab'-AT により 16 倍、IgG-AT により 32 倍の感度向上を認めた。IgG-AT は調製条件によって oligo (dA-dT) 標識数の異なる IgG が生成されるため、IgG-AT の品質管理が不可欠である。そこで、IgG に対する oligo (dA-dT) の標識数を定量する方法を確立した。

## A. 研究目的

BSE の確定診断は WB と免疫組織化学 (IHC) の 2 つの結果を合わせて行われているが、非定型例や若齢牛の検体では WB と IHC で異なる結果が出ている。これは WB と IHC の検出感度差に起因するものと考えており、既存の IHC のための増感法では感度差を克服できていない。そのため、新しい IHC のための増感技術が求められている。感度を高める手段としては、RI のようなシグナルの強力な化合物を免疫複合体に導入する方法とシグナルの弱い化合物であっても免疫複合体に多数導入する場合とがある。IHC で広く普及している ABC 法、デキストランポリマー (DP) 法は何れも後者であり、アビジンや抗体と酵素の超高分子複合体が増感に寄与する本体である。この超高分子複合体は組織表面の抗原を検出する目的では問題にならないが、組織内部の抗原検出には分子が大きすぎる。そこで、増幅本体が抗原を認識するまでは小さく、認識後に超高分子複合体となる技術開発を行っている。具体的には、免疫複合体を自己伸長性 DNA : oligo (dA-dT) で標識し、酵素反応により DNA が伸長する過程でハプテンを多数取り込ませ、そのハプテンを認識する酵素標識抗体を反応させるものである。この自己伸長性 DNA の配列はアデニンとチミ

ンの交互配列であることから、immunoAT-tailing (IAT) 法と命名している。

これまでに IAT 法の基本原理を確立し、BSE 病理標本における増感法として応用できることを確認した。IAT 法を実用性の高い技術とするためには、さらに感度を高める必要がある。そのため、自家調製した oligo (dA-dT) 標識抗体の物性検討と精製条件の確立が不可欠と考え、それらの検討を実施した。

## B. 研究方法

### 1) IAT 法による IHC

BSE 陽性ウシの脳組織切片を既報の前処理後、抗 PrP 抗体 (マウスモノクローナル抗体 B04) を反応させる。洗浄後、二次抗体として 15 塩基の oligo (dA-dT) 標識抗マウス IgG ウサギ IgG, Fab' (Fab'-AT) を反応させる。次に、oligo (dA-dT) は digoxigenin 標識 dUTP 存在下で DNA ポリメラーゼ (Klenow fragment, exo-) により伸長させて poly (dA-dT) とし、poly (dA-dT) は多数の digoxigenin で標識した。その後、HRP 標識抗 digoxigenin 抗体を反応させ、DAB による呈色反応を行った。感度の比較対照として、DP 法の一つである Envision+ (Dako) を使用した。

## 2) Fab'-AT の調製

抗マウス IgG ウサギ IgG, F(ab')<sub>2</sub> を 2-メルカプトエチルアミンで還元し、簡易ゲル濾過により Fab' を精製した。また、5' アミノ化 oligo(dA-dT) を sulfo-SMCC と反応させ、簡易ゲル濾過によりマレイミド化 oligo(dA-dT) を精製した。Fab' とマレイミド化 oligo(dA-dT) は 1:20 のモル比で混和して 4°C 一晩反応させ、ゲル濾過 (HPLC) で Fab'-AT を分取した。

## 3) IgG-AT の調製

抗マウス IgG ウサギ IgG を 2-イミノチオレンで還元し、ゲル濾過により還元 IgG を精製した。そして、上述のマレイミド化 oligo(dA-dT) と 1:20 のモル比で混和して 4°C 一晩反応させた。IgG-AT はゲル濾過 (HPLC) で分取した (図 1)。

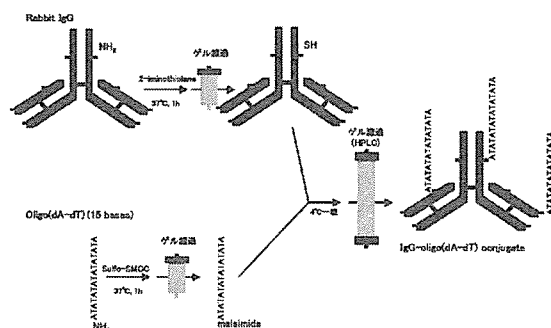


図 1 IgG-AT の調製法

## 4) 動的光散乱 (DLS) 法解析

oligo(dA-dT) 標識抗体の粒径は、DLS 法により測定した。使用した機器は Zetasizer nano ZS90 (Malvern) で、測定は 20°C または 37°C で行い、15 回の計測平均値を 1 回の測定値とし、3 回の測定値の平均を被検体の粒径とした。比較対照として、IgG, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' の粒径も同時に測定した。

## 5) ELISA

Fab'-AT と IgG-AT による IAT 法の検出感度を比較するため、2 倍希釈列の HBs 抗原を 96 ウェルプレートに固相化し、3% スキムミルクでブロッキング後、抗 HBs マウスモノクローナル抗体、次いで抗マウス IgG ウサギ Fab'-AT または IgG-AT を反応させた。IAT 法の条件は IHC と同一であるが、発色剤は DAB の代わり

に可溶性 TMB を用いた。2 規定硫酸で反応停止後、450 nm の吸光度を測定した (N=3)。比較対照には、HRP 標識抗マウス IgG ウサギ IgG を反応させた。

## 6) oligo(dA-dT) 標識数の推定

既知モル濃度のウサギ IgG と oligo(dA-dT) を容積一定で任意の比率で混合し、260 nm と 280 nm の吸光度を測定した。そして、A260/280 と oligo(dA-dT)/IgG の標準線を作成した。次に IgG-AT の 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し、上記標準線にプロットして 1 分子の IgG 当たりの oligo(dA-dT) 標識数を推定した。

## 7) イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーは DNA 未標識抗体の除去を行うために有効と考え、モデルとして 72 塩基の ssDNA を研究方法 3 と同様にして IgG に標識した。IgG-ssDNA はゲル濾過 (HPLC) で分取し、さらにイオン陰交換クロマトグラフィーにより IgG-ssDNA を分取した。それぞれの段階で IgG-ssDNA の 260 nm と 280 nm の吸光度を測定した。

(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。

## C. 研究結果

### 1) IHC による IAT 法と DP 法の比較

Fab'-AT を用いた間接 IAT 法と DP 法との感度比較は、B04 の希釈列を用いて行った。DP 法 (Envision+) では B04 の 4 万倍希釈で僅かに陽性染色が認められた。一方、IAT 法では B04 の 16 万倍希釈でも強い陽性染色を認められた (図 2)。このことから、IAT 法は DP 法の少なくとも 4 倍以上高感度であることが推定された。

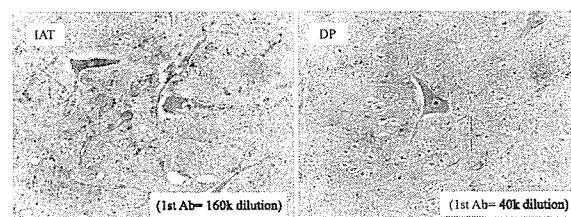


図 2 ICH による PrP<sup>Sc</sup> の検出

## 2) DLS 法による抗体の粒径測定

DLS 法は溶媒中微粒子のブラウン運動を利用した測定法で、2つのレーザーを試料に当て、透過した2つの散乱強度の相関係数より粒径を求めるものである。測定条件は室温 20°C と酵素反応温度 37°C としたが、これは 15 塩基の oligo(dA-dT) の T<sub>m</sub> 値が低く、温度変化によって自己鎖内に二重鎖を形成したり解離したりして粒径が変化すると考えたためである。測定結果は予想通りに IgG-AT > IgG > Fab'-AT > Fab'であった(表 1)。また、Fab'-AT はほぼ F(ab')<sub>2</sub> と同じ大きさであった。一方、粒径は oligo(dA-dT) が一本鎖状態の 37°C が大きいと考えたが、20°C の時に比べてわずかに小さかった。しかし、この傾向は oligo(dA-dT) 未標識抗体でも認められたことから、oligo(dA-dT) の様態によるものではないと思われる。

表 1 DLS 法による粒径測定

Antibody	20°C		37°C	
	Average (nm)	Width	Average (nm)	Width
IgG	9.58	1.03	9.56	1.06
F(ab') <sub>2</sub>	8.18	1.34	7.71	0.9
Fab'	6.62	1.39	6.09	1.28
IgG-AT	12.29	2.75	11.24	2.07
Fab'-AT	8.11	1.51	7.78	1.33

## 3) ELISA による Fab'-AT と IgG-AT の比較

Fab'-AT の抗原結合能は一価であり、IgG-AT の抗原結合能は二価である。また、Fab'-AT では oligo(dA-dT) が H 鎖のヒンジ部に標識されるのみで粒径も IgG より小さい。一方、IgG-AT には oligo(dA-dT) が複数標識され、抗原結合部位を oligo(dA-dT) でマスクされる場合もある。そこで、IHC のモデルとしての ELISA において、2つの抗体のシグナル増幅効果を比較した。従来法による抗原検出限界が 1.25 ng/ml である時、Fab'-AT を用いた IAT 法では 78 pg/ml (従来法の 16 倍)、IgG-AT を用いた IAT 法では 39 pg/ml (従来法の 32 倍) であった(図 3)。この結果より、IHC における IAT 法でも Fab'-AT より IgG-AT が適していると推定された。

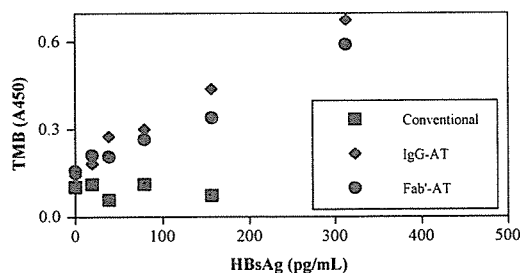


図 3 HBs 抗原を検出する ELISA による検出感度比較

## 4) IgG-AT 調製法の標準化

IgG-AT の調製法(図 1)において、2-イミノチオレンによる還元条件により oligo(dA-dT) の標識数が変わる。従って、還元条件の標準化が必要で、そのためには oligo(dA-dT)/IgG の定量法を確立する必要がある。そこで、既知濃度の IgG と oligo(dA-dT) を任意の比率で混和し、260 nm と 280 nm の吸光度を測定して相関関係が認められないか調べた。その結果、A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> と oligo(dA-dT)/IgG との間に相関関係が認められた(図 4)。

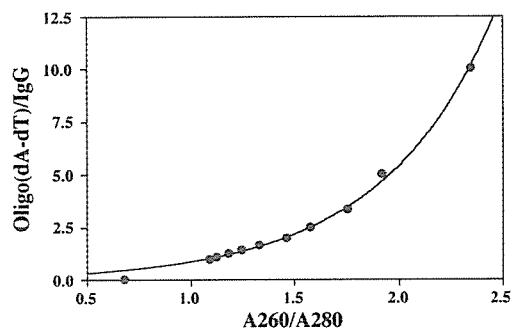


図 4 吸光度と oligo(dA-dT)/IgG の相関関係

IgG を 40 倍または 320 倍過剰の 2-イミノチオレンで処理し、次に還元 IgG に対して 20 倍過剰のマレイミド化 oligo(dA-dT) を反応させると、前者では oligo(dA-dT)/IgG=1.0、後者で oligo(dA-dT)/IgG=2.9 であった(図 5)。

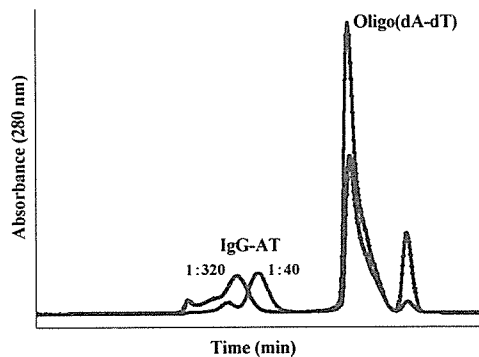


図 5 oligo(dA-dT) 標識数の異なる IgG-AT のゲル濾過(HPLC) 精製

また、320 倍過剰の 2-イミノチオレンで処理して得た IgG-AT の HPLC 精製画分を詳細に調べると、最初の小ピーク画分は oligo(dA-dT)/IgG=5.4、大ピーク画分は 2.9 であった(図 6)。

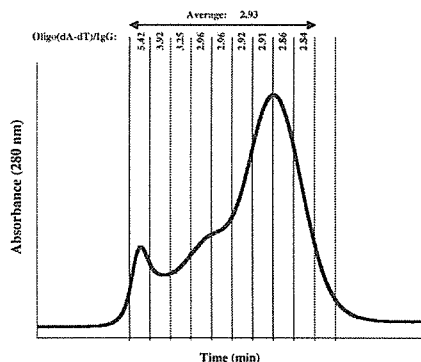


図6 IgG-ATのゲル濾過(HPLC)画分による oligo(dA-dT) 標識数

### 5) IgG-AT と IgG の分離精製

IgG-AT と IgG はゲル濾過で分離することができないため、精製した IgG—AT 画分には IgG を含み、それは IAT 法のシグナル増幅効果を阻害する。そこで、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離を試みた。予備検討において IgG と IgG-ssDNA と分離できる条件を決定し、IgG-ssDNA 画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた (N=2, 図 7)。その結果、IgG のピークは認められず、A260/A280 も陰イオン交換クロマトグラフィー前後で 1.8→1.7、1.5→1.6 と著しい差を認めなかった。

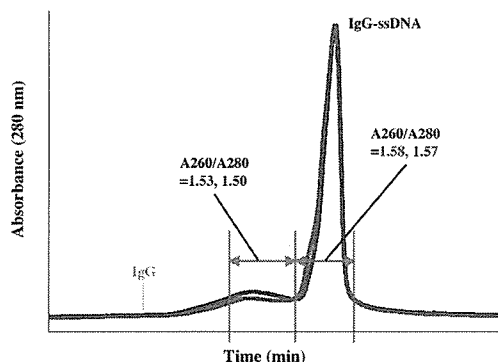


図7 IgG-ssDNA 画分のイオンクロマトグラフィー解析

### D. 考 察

Fab'-AT を用いた間接 IAT 法は IHC の既存増感法である DP 法に比べて、少なくとも 4 倍高感度であると見込まれる。IAT 法のために Fab'-AT を採用した理由は、粒径が小さいこと、oligo(dA-dT) の結合部位が H 鎖の SH 基であると特定できるため、安定した oligo(dA-dT) 標識抗体の調製が可能と考えたためであった。本研

究では IAT 法のいっそうの高感度化を目指し、IgG-AT についても検討を行った。そして、DLS 法解析により、Fab'-AT は F(ab')<sub>2</sub> 程度の粒径であったが、IgG-AT でも約 12nm と十分に小さい粒子であることが確認された。また、ELISA では Fab'-AT による IAT 法よりも、IgG-AT による IAT 法が 2 倍高感度であることも確認された。以上のことから、今後の IAT 法開発では IgG-AT により検討するべきであると考え。

この IgG-AT は、調製過程の 2-イミノチオールの処理条件によって、IgG に標識される oligo(dA-dT) 数は変化する。そのため、Fab'-AT の調製に比べてロット間差が生じ易いのではないかと考えた。しかし、日を変えて再現性実験を行ったところ、有意なロット間差を認めなかった (図 7 参照)。また、還元 IgG に対して 20 倍過剰のマレイミド化 oligo(dA-dT) を反応させる調製条件では、ほとんどの抗体が oligo(dA-dT) で標識されており、IgG-AT 画分からの IgG 除去は不要で、精製はゲル濾過 (HPLC) による IgG-AT と oligo(dA-dT) の分離のみで十分であった。

今後は oligo(dA-dT) 標識数の異なる IgG-AT を調製し、ELISA や IHC により評価を行う。それにより、IgG への oligo(dA-dT) 標識数とシグナル増幅効果の関係を明らかにする。さらに、一次抗体についても IgG-AT を調製して同様の検討を行う。最終的には IAT 法による検出感度が従来法の 2 桁以上向上するよう改良を加えていく。

### E. 結 論

IAT 法によるシグナル増幅効果は、Fab'-AT を用いるよりも IgG-AT を用いた方が優れていた。また、IgG-AT の調製法と物性評価法とを確立した。

### 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) 花木賢一, 中島典子, 樋口好美, 大岡静衣, 野本明男, 佐多徹太郎: 新規核酸シグナル増幅法によるウシ脳切片からの異常プリオンの検出. 第 141 回日本獣医学会学術集会 (筑波), 2006 年 3 月.
- 2) 花木賢一, 中島典子, 大岡静衣, 野本明男, 佐多徹太郎: oligo(dA-dT) 標識抗体の調製と診断法への応用。第 54 回日本ウイルス学会 (名古屋), 2006 年 11 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願  
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作製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 (国立感染症研究所 細胞化学部)

佐多徹太郎、飛梅 実 (国立感染症研究所 感染病理部)

研究要旨 中枢神経系などで正常個体のプリオン蛋白質発現パターンを持つ新規のマウスプリオンノックアウト・ウシプリオン TG 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進め、3.6 kbp のマウスプリオンプロモーター、ウシプリオン cDNA 0.8 kbp と hGH 遺伝子断片 2.0 kbp を組み込んだトランスジーンを構築し、マウス受精卵に注入し、TG マウスを作製した。今後、新規のウシプリオン単独発現 TG マウスを樹立し、異常プリオンの高感度バイオアッセイ系として応用する。

### A. 研究目的

平成 13 年にウシ海綿状脳症 (BSE) 罹患ウシの本邦での初発例が確認されて以来、平成 18 年末までに合計 32 頭の BSE 陽性ウシが報告されている。また、この間、アメリカでも BSE 罹患ウシが報告され、米国産牛肉の輸入停止措置が執られるなど、BSE 問題は引き続き食の安心・安全にとって国民の大きな関心の的となっている。これらのことから本邦では、高度な BSE 検査体制が整備されてきており、食に対する安全確保に大きな役割を果たしている。この BSE 異常型プリオンの検出には 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) に耐性である異常型を検出している。

現在、BSE 由来組織中の異常型プリオンの量・PK 抵抗性と病原性との関連に関する知見は少ない。これらの関係に対する知見の蓄積は、現在守られている食の安全をさらに強固にするものと考えるが、異常型プリオンの病原性を早期に評価できるモデル系はまだ少なく、ウシ型プリオン発現トランスジェニック (TG) マウス等の作出が不可欠である。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 を用いて各種臓器でウシプリオンを高発現する TG マウスを作製し、BSE 由来脳乳剤接種試験を行い、脾臓等での異常型プリオンの蓄積を早期に検

出することが可能となった。しかしながら、神経症状発症の期間短縮に至らず、マウス生体内での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、とくに中枢神経系などで正常個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 TG マウスの作製を目的として、昨年度に引き続き、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進めた。さらにマウスプリオンプロモーターを用いたウシプリオン発現用のトランスジーンを構築し、受精卵への注入により、TG マウスを作製した。

### B. 研究方法

#### 1) マウスプリオンプロモーター領域の解析

C57BL/6J マウス脾臓よりゲノム DNA を抽出し、マウス第 2 染色体のマウスプリオン遺伝子エクソン 1 を含む上流域 5.5 kbp を PCR にて増幅しクローニングした。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、上流域 5.5 kbp、3.6 kbp、2.9 kbp 及びこれらにエクソン 1 を含むものを、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。さらに、発現効率を良くするためにヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子断片 2.0 kbp を組み込んだ構築も作製した。また、比較としてサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを用いた。これらの構築を含む 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) をマウス神経細胞株 N2a とマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 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、プロモーター活性 (比活性) を求めた。

## 2) トランスジェニックマウスの作製

マウスプリオンプロモーター領域の解析結果より、マウスプリオンプロモーターとして高いプロモーター活性を示した上流域 3.6 kbp を用い、ウシプリオン cDNA 0.8 kbp と hGH 遺伝子断片 2.0 kbp を組み込んだトランスジーンを構築した (図 2)。このトランスジーンのアパI-NotI フラグメント約 6.5 kbp を C57BL/6J マウス前核期胚に注入し、偽妊娠雌マウスに胚移植して、TG マウスを得た。TG マウス陽性個体の判定には、ウシ cDNA およびマウスプロモーター領域を PCR にて特異的に増幅することによって判定した。用いたプライマーは図 2 に示した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。組換え DNA 実験は当該委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果、考察

マウスプリオン遺伝子上流域 5.5 kbp または 3.6 kbp を含み、発現効率を良くするためにヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子断片を結合させたルシフェラーゼアッセイ用のコンストラクトを作製し、N2a 細胞と NIH3T3 細胞にトランスフェクトし、プロモーター活性を調べた (図 1)。その結果、CMV プロモーターに比べれば低いですが、昨年度作出した 5.5 kbp および 2.9 kbp のプロモーター (図 1 中、5.5 k、2.9 k と示す) に比べ、5.5 kbp と 3.6 kbp

(図 1 中の、2 と 4) のプロモーター領域が hGH 遺伝子断片を組み込むことで高い活性を示した (但しエクソン 1 を欠く場合のみ)。そこで TG マウス作製には 3.6 kbp のプロモーター領域を利用することにし、3.6 kbp のプロモーター領域、ウシプリオン cDNA および hGH 遺伝子断片を含む TG 作製のコンストラクト (図 2) を構築し、この DNA をマウス前核期胚に注入して TG マウス候補を 50 匹得た。このうちウシプリオン cDNA

検出用 PCR スクリーニングでは、2 匹が陽性、プリオンプロモーター領域検出用 PCR スクリーニングではこの 2 匹中 1 匹が陽性と判定された。今後、プリオン蛋白発現などを検索し TG マウスを系統化し、プリオンノックアウトマウスと交配して新規のウシプリオン単独発現 TG マウスを樹立する。

## D. 結 論

中枢神経系などで正常個体のプリオン蛋白質発現パターンを持つ新規のマウスプリオンノックアウト・ウシプリオン TG 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進め、3.6 kbp のマウスプリオンプロモーター、ウシプリオン cDNA 0.8 kb と hGH 遺伝子断片 2.0 kbp を組み込んだトランスジーンを構築し、マウス受精卵に注入し、TG マウスを作製した。今後、新規のウシプリオン単独発現 TG マウスを樹立し、異常プリオンの高感度バイオアッセイ系として応用する。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

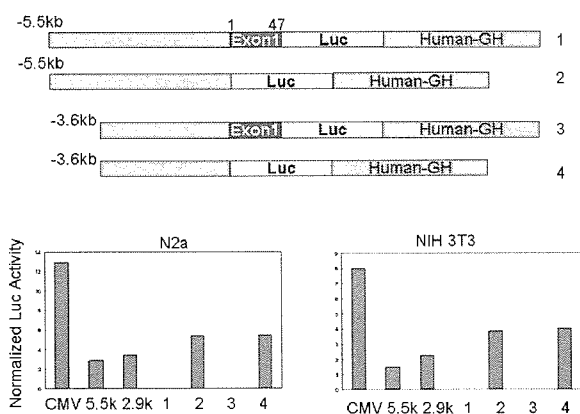


図1. N2a および NIH 3T3 細胞でのマウスプリオンプロモーター活性 (pGL-3basicを用いたluciferase assay)

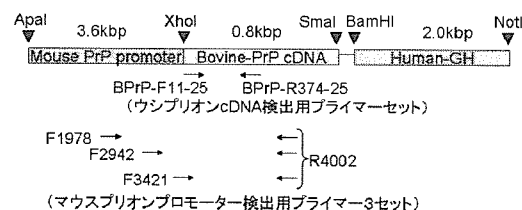


図2. マウスプリオンプロモーターによりドライブされるBovine PrP TG作製用トランスジーン(全長~6.5kbp)

### 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・プロテオーム解析

分担研究者 萩原 健一 国立感染症研究所 細胞化学部

研究協力者 大内史子、山河芳夫、中村優子（感染研・細胞化学部）

研究要旨 異常型プリオン蛋白質に対する選択性に優れた検出方法の開発を目指した研究を行った（前年度からの継続研究）。また本年度から、既に本研究班において実施中の‘プリオン病の病態解析を目的としたプロテオーム研究’（前年度までの分担研究者：国立感染症研究所・山河芳夫博士）を引継ぎ、前年度までに得られた研究成果に更なる検討を加えた。その結果、プリオン病の発症に伴い、神経細胞の軸索伸長・退縮を担う細胞内の情報伝達たんぱく質である CRMP-2 の C 末端領域を欠失した分子種が増加することを見出した。この C 末端領域は、軸索伸長・退縮における情報伝達の制御に重要であることが指摘されており、プリオン病における神経変性過程とシグナル制御との関わりを示唆して極めて興味深い。更に本年度は、屠畜場における BSE 検査により 2006 年 3 月に摘発された国内 2 例目の非定型 BSE（長崎例）の生化学的解析ならびに近交系マウスへの伝搬実験（進行中）を行った。

#### 【1】選択性に優れた高感度分析法の開発

研究目的・方法・結果

わが国の屠畜場における BSE 検査は、食肉衛生検査所において屠畜後のウシから延髄門部を採取して、BioRad 社製・プラテリア BSE キット、同テセー BSE キットなど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。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対象とする ELISA 法では、ホルモンなどの可溶性分子と比較して、抗原部位が十分に露出し難いという問題点がある。効率の良い検査には、微量の異常型プリオン蛋白質を含む検体を見逃さずに、かつ陽性・陰性の判定閾値を可及的に低く設定することが望まれる。そこで、現行スクリーニング検査を将来的に相補できる選択性に優れた簡便な分析法の開発を目指し、昨年度は、変性操作により抗原エпит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マイクロビーズ（固相）にチオエーテルを介して固定化後に、マイクロ流路系において蛍光検出する、という方法を試みた。モデル実験において、本法は期待した実用的な検出感度が達成できたものの、スクリーニング法としての汎用性を考

えると、必ずしも操作法が簡便ではなかった。本年度は、操作手技の簡便化を目的として、固相化をビーズ上の代わりにマイクロプレート上へ移行させて検討を行ったが、前年度のビーズ法の成果と比較して、感度・操作性の上で大きな改善は得られなかった。

#### 【2】病態解析を目的としたプロテオーム研究

2-A. 研究目的

プリオン病における神経細胞の変性・脱落に至る分子機構の解明を目指して、また、疾病の指標となるたんぱく質を検索することを目的として、プリオン病の進行・発症過程において量的・質的に変動する脳内たんぱく質を対象としたプロテオーム研究を行った。

2-B. 研究方法

プリオン病の発症モデルとして、プリオン病病原体（Obihiro-I 株）を脳内接種した ICR および C57BL/6J マウスを用いた。接種マウスおよび同系統の健常マウスから経日的（約 30～40 日ごと、3 匹）に脳を摘出し、リン酸緩衝液にて脳ホモジネートを調製し、その可溶性画分を