

二次元電気泳動により分離した。泳動後のたんぱく質を Coomassie Brilliant Blue (CBB) を用いて染色し、プリオン接種マウスと健常マウスの二次元電気泳動像を相互に比較した。プリオン病の進行・発症に伴って染色強度等が変動するスポットをゲルから切出し、ゲルに含まれるたんぱく質をゲル内酵素消化(トリプシン等による)を行った。消化断片を LC-質量分析にかけ、観測される質量数をたんぱく質のアミノ酸配列データベースと照合することにより、目的とするたんぱく質を同定した。一方、疾病の進行に伴う PrP^{Sc} の蓄積は、ホモジネートをプロテナーゼ K 消化後、ウェスタンブロット法により確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認下にて実施し、また、感染材料の取り扱いには国立感染症研究所のバイオセーフティ管理規程を遵守した。

2-C. 研究結果

脳における PrP^{Sc} の蓄積はプリオン接種後の約 116 日目以降から認められた。また、組織染色像においても同時期以降から脳の空胞変性が顕著に観察された。接種後から致死に至るまでの日数は、約 180 日であり、この潜伏期～発症に至る経過は、既報 (*Jpn. J. Infect. Dis.*, **58**, 78-82, 2005) と合致していた。

このような実験的なプリオン病発症マウスの脳の可溶性画分は、二次元電気泳動において約 260 個の CBB 染色スポットを与えた。これらの染色スポットの変化を経日的に追跡したところ、潜伏期間中(接種後 70 日以前)には顕著な変動を示すスポットは認められなかった。一方、PrP^{Sc} の蓄積に伴って(接種後 116 日以降)、約 25% のスポットでは、各々のスポットに対応するたんぱく質量を反映して、染色強度の変動が認められた。健常マウスとの比較から、これらの染色強度の変化は加齢によるものではなく、プリオン病の進行・発症と密接に関連した変化であることを確認した。質量分析法による解析の結果、顕著な変化を示すスポットは、それぞれ 1) glial fibrillary acidic protein (GFAP)、2) peroxiredoxin-2、-6、および glutathion S-transferase といった‘抗酸化ストレスたんぱく質群’、3) collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) などのたんぱく質に対応することが明らかとなった。特に CRMP-2 に関しては、その全長型が減少し、代替的に C 末端領域を欠失した分子種が増加していることがわかった(図 1)。この欠失領域については、MS/MS-質量分析法による詳細な解析を進めて、その領域を特定することに成功した(投稿準備中)。

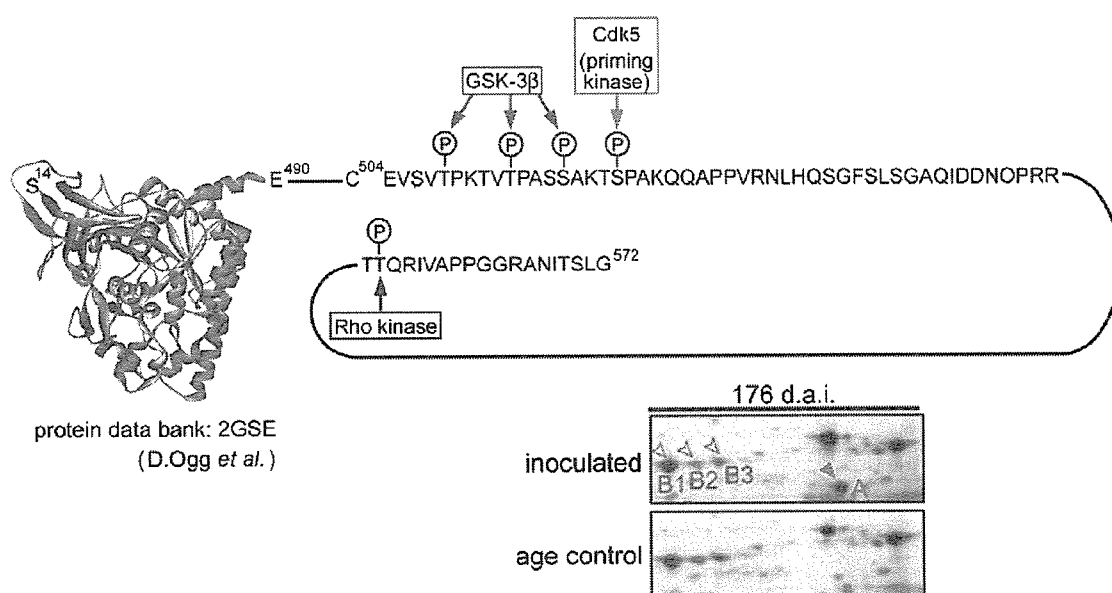


図 1. CRMP-2 の軸索伸長・退縮活性に重要であると考えられているリン酸化部位とプリオン接種マウスにおける CRMP-2 の全長型 (B1~3) および短鎖型 (A) の発現

2-D. 考察

GFAP の増加は神経細胞の脱落に伴うグリア細胞の増加に起因すると考えられた。また、抗酸化ストレスたんぱく質群の増加は、PrP^{Sc} の蓄積が何らかの酸化ストレスを神経細胞やグリア細胞等に負荷することによるためではないかと予想された。

本研究においては、プリオン病の進行・発症に伴ってCRMP-2の全長型が減少し、C末端部を欠失した分子種が増加していることが、明らかとなった。CRMP-2は、collapsin (= semaphorin) による神経細胞の軸索伸長・退縮シグナル伝達系の細胞内情報伝達を担う蛋白質であり、C末端領域に存在する複数のSer/Thr 酸基がGSK-3 β 、CDK5、Rho-kinaseなどによりリン酸化されることにより活性が制御されている(図1)。活性制御に重要なC末端領域を欠くCRMP-2の増加は、PrP^{Sc}の蓄積(疾病の進行)に伴う神経変性過程に、軸索伸長の情報伝達系の何らかの異常化が関与している可能性を強く示唆している。従来、プロテオームやトランスクリプトーム解析によって、プリオン病の‘病態関連たんぱく質’がリスト・アップされているが、そのほぼ全ては‘量的変動’を指標としたものであり、また、病態との関連も明確ではないものが多い。今回の成果は、CRMP-2が‘質的変動’を示す点、および神経軸索の伸長・退縮を直接制御する分子である点において、非常に興味深いと考える。

【3】非定型BSE(長崎)の生化学的性状の初歩的解析および近交系マウスへの伝搬実験

3-A. 研究目的

2006年3月に摘発されたBSE例(長崎例)においては、ウエスタンブロット分析により検出される異常型プリオン蛋白質の糖鎖付加の生化学的特徴が、従来の典型的BSEよりもむしろヒト・孤発性CJDに類似する‘非定型’BSEであった。この非定型BSEの初歩的な生化学データを収集すること、その感染性の有無について検証を行なうこと、更に(感染性を有する場合には)非定型BSE株を伝搬・継代すること、を目的とした研究を行った。

3-B. 研究方法

非定型BSE例(長崎例:169ヶ月例)の検

体組織からゲノムDNAを精製し、PrPコード領域の上流約260塩基から下流約930塩基までをPCRにより増幅し、そのDNA塩基配列を直接シーケンシング法により決定した。また、屠畜場において廃棄されずに回収可能であった大脳(視床などの部位は欠く)、眼球等について、各部位に蓄積したPrP^{BSE}の糖鎖付加パターンを生化学的特徴を解析した。更に、非定型BSE例の感染性の有無を検証するために、定型例(和歌山例:96年2月生れ/83ヶ月例、および熊本例:99年7月生れ/62ヶ月例)の対照接種群とともに、近交系マウス3系統:C57BL/6J(6週齢♀)、SJL(6週齢♀)およびRIIIマウス(4~8週齢♀)へ脳内接種した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認下にて実施中であり、また、感染材料の取り扱いは国立感染症研究所のバイオセーフティ管理規程を遵守している。

3-C/D. 研究結果・考察

非定型例(長崎例)のPrPコード領域にはアミノ酸変異を生じるようなコドンの変異は存在しなかった。国内のウシ*prnp*に認められるGln⁷⁸およびAsn¹⁹²のコドン多型は、それぞれCAG(ホモ接合体)およびAAT(ホモ接合体)であった。また、配列分析を行ったコード領域の上流・下流にもDNA配列の変異は認められなかった(以上、参照配列は、GenBank:AJ298878)。また、ウエスタンブロット法による分析の結果、PrP^{BSE}は大脳の前頭葉から頭頂葉にかけて広く分布するが後頭葉での蓄積は少なかった。検出されるPrP^{BSE}の糖鎖付加パターンは、大脳の各部位や網膜において一貫した非定型を示し、部位によるパターンの差異は認められなかった。

一方、扁桃、リンパ節、筋肉(肋間筋)および副腎などの入手可能であった臓器についてPrP^{BSE}の存在・分布について分析した結果、非定型BSE例(長崎例)は従来の典型BSE例と同様に、これらの臓器におけるPrP^{BSE}量は、今回用いたウエスタンブロット分析法の検出限界以下であった。

近交系マウスへの感染実験は、現在、経過を観察中である。

E. 結 論

本年度は、プリオン病の病態解析を目的としたプロテオーム研究を重点的に推進し、疾病の進行に伴って特異的に変動する脳内の可溶性たんぱく質を数種類同定できた。特に、プリオン病の神経変性過程に関与する可能性が高いと考えられるたんぱく質を同定できたことは、神経変性の分子機構に関する今後の研究への重要な指標を与えること期待できる。

また、国内で摘発された2例目の非定型 BSE (長崎例)について、その PrP^{BSE} の臓器分布、遺伝子解析を速やかに実施し、学会等において公表した。非定型 BSE の性状に関しては未だ解明すべき点が多く残されているが、上記の解析データの公開は、学術ならびに厚生行政において意義深いと思われる。

高精度・高感度分析法の開発に関しては、本年度は著しい進展は得られなかった。来年度の重点課題であると銘じている。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara K, Nakamura Y, Nishijima M, Yamakawa Y: Prevention of prion propagation by dehydrocholesterol reductase inhibitors in cultured cells and a therapeutic trial in mice. Biol Pharm Bull. (電子版:2006年1月公開 <https://denshi.pharm.or.jp/home/pubpharm/pubview.asp?p=b060927>)

2. 学会発表

- 1) Hagiwara K, Nakamura Y, Yamakawa Y: プリオン病とたんぱく質・脂質・糖鎖生化学の接点(招待シンポジスト). 第19回バイオメディカル分析科学シンポジウム(主催:日本薬学会・物理系薬学部会)(福岡)2006年8月
- 2) 大内史子、萩原健一、中村優子、西島正弘、山河芳夫:プリオン病のプロテオーム解析～発症に伴う CRMP-2 の量的・質的变化の解析～. 2006年プリオン研究会(安比)2006年9月
- 3) 萩原健一、佐藤由子、中村優子、飛梅 実、

山河芳夫、佐多徹太郎:非定型的 BSE プリオン(佐世保例)の生体内分布. 2006年プリオン研究会(安比)2006年9月

- 4) Hagiwara K, Nakamura Y, Yamakawa Y, Sato Y, Tobiume M, Sata T, the Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW): Studies on the second atypical BSE case in a Japanese Black cow. NeuroPrion 2006, October 2006, Torino, Italy.

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質の 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

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

研究要旨 蛍光相互相関分光法を (FCCS) を用いて、プリオン感染マウスから異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の検出を試みた。その結果、プリオン感染マウスの脳乳剤を4の6乗倍希釈、つまり蛋白質濃度にして0.13 nMに希釈したときまで PrP^{Sc} を検出することが可能であった。この検出感度は、市販のELISAキットと同程度であった。さらに検出感度を高めるため、多分子の抗体を融合させた半導体量子ドット (Qdot) をプローブとして用い、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、緩衝液中で rBoPrP を0.029 nMまで検出することが可能であった。この検出感度はQdotを用いない場合に比べ、約5倍高かった。加えて、Qdotを用いることによって一波長励起が可能となるため、装置の簡素化・低額化が期待できる。今後は、Qdotへの抗体の結合法の検討と感染牛からの PrP^{Sc} 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。検査の対象となる試料の数は膨大であり、現行のELISAと同等以上の感度を有したより迅速簡便なBSE検査法が求められている。

蛍光相関分光法 (FCS) は、共焦点光学系を用いた微小領域 ($\sim 10^{-16} \text{l}$) の蛍光強度のゆらぎを計測する方法である。このゆらぎを相関関数を用いて解析し、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。測定に要する試料体積は μl 以下、測定濃度は nM 程度でよい。蛍光相互相関分光法 (FCCS) は、FCS を発展させた計測法である。2種類の蛍光分子と2つ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計測する。解析は相互相関関数を用いて2種類の信号の同時性、つまり2種類の分子がどの程度同方向へ並進拡散しているかを評価する。したがって、プリオン蛋白質 (PrP) を介して結合する2種類の抗 PrP 抗体の時空間的同時性を解析し、試料中の PrP の有無を判別することが可能となる。FCCS 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とされている。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ている。

前回までは、FCS および FCCS を用いて組換え牛プリオンタンパク質 (rBoPrP) を検出できたことを報告した。FCS を用いた場合、緩衝液中での検出限界値は 0.44 nM だった。FCCS 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 だった。検査場での使用を想定して開発した小型 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 だった。

今回は、小型 FCCS 装置を用いて、プリオン感染マウスから異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の検出を試みた結果を報告する。検出感度をさらに高めるため、半導体量子ドット (Qdot) をプローブとして用いた場合の検出感度についても合わせて報告する。

B. 研究方法

1) 材料

rBoPrP と抗プリオン抗体 (72 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 を用いた。

2) 抗体の蛍光標識

抗プリオン抗体 (72 と 44B1) に対して蛍光色素で標識を行った。標識には、Alexa Fluor-488 tetrafluoropheny ester (Abs/Em: 495/519) と Alexa Fluor-647 succinimidyl ester (Abs/Em: 650/668) (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 1.4 個 (72-Alexa488)、3.9 個 (72-Alexa647)、3.6 個 (44B1-Alexa488)、1.6 (44B1-Alexa647) であり、どれも過剰標識ではなかった。

また、Alexa の代わりに Qdot655 (Em: 655) (インビトロジェン) をプローブとして、抗プリオン抗体 (72) に標識を行った。標識はマレイミド基で活性化した Qdot に対して、還元してチオール基を生じさせた抗体を反応させて行った。1 つの Qdot あたり、4 個の Fab が結合していると推定される。

3) 測定機器

FCCS 測定には、小型 FCCS (浜松ホトニクスと共同開発) を用いた。本装置は、2 本の LD 励起固体レーザー (473, 635 nm)、水浸対物レンズ (U-Apochromat, 40x, 1.15NA, オリンパス)、2 つの PMT 検出器 (H8631-40, 浜松ホトニクス) から成る。蛍光は 570 nm のダイクロイックミラーで分離し、495-575 nm と 650 nm 以上のフィルターを通した後、2 つの検出器で受光した。

ELISA の吸光度測定には、GENios (テカン) を用いた。

4) プリオン感染マウスからの PrP^{Sc} 抽出

感染動物として、スクレイピー帯広株感染マウスを用いた。感染マウスの脳乳剤を牛延髄の脳乳剤で順次 4 倍ずつ希釈し、4 の 1 乗から 4 の 7 乗倍までの希釈系列を用意した。

PrP^{Sc} の抽出は、BSE 検出用 ELISA (フレライザ BSE、富士レビオ) を用いて行った。ただし、FCCS は蛍光測定であるため、フレライ

ザ BSE 付属の色付き蛋白質分解酵素と検体希釈液は用いず、別途調製した。抽出液中に存在する戎雑物を除くため、5 分間のボイルの後、3,000×g で 3 分間の遠心操作を行った。尚、この操作で PrP^{Sc} の量が減少しないことを、ELISA を用いて確認している。さらに夾雑物の影響を軽減するため、FCCS を用いて検出する際には抽出液に対して検体希釈液を 6 倍量加えた (ELISA は 2 倍量)。

C. 研究結果

1) FCCS の検出限界値 (プリオン感染マウス)

プリオン感染マウスを用いて、FCCS の検出限界値を検討した。検出には、Alexa488 と Alexa647 でそれぞれ蛍光標識した 72 (0.1 nM) と 44B1 (0.09 nM) を用いた。

室温での 60 分間の抗原抗体反応の後、FCCS 測定を行った。検出感度は、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、PrP と 72-Alexa532、44B1-Alexa647 から成る 3 量体の量に比例する。

その結果、FCCS を用いてプリオン感染マウスから 4 の 6 乗倍希釈まで PrP を検出することが可能であった。この検出感度は、フレライザ BSE の検出感度と同程度であった。rBoPrP を用いて 4 の 6 乗倍希釈の試料中の PrP 濃度を算出したところ、0.13 nM であった。この値は、前回報告した緩衝液中および牛脳抽出液中での rBoPrP の検出限界値と一致した。比較のため、前回まで報告した緩衝液中と牛脳抽出液中での検出感度、今回報告したプリオン感染マウスでの検出感度、さらに ELISA の検出感度を Table 1 にまとめた。

Table 1. Detection limits for rBoPrP and PrP^{Sc} using FCS, FCCS and ELISAs

Methods	rBoPrP		PrP ^{Sc}
	in PBS (pH 7.3) (nM)	in BSE-negative samples (nM)	from infected mice (Dilution rate)
FCS	0.44±0.13 (n=5)	ND	ND
FCCS	0.13±0.03 (n=3)	0.13±0.03 (n=3)	4 ⁶ (0.13 nM) ^a [n=3]
ELISA (Bio-Rad)	0.15±0 (n=3)	0.15±0 (n=3)	ND
ELISA (Fujirebio)	0.05±0 (n=3)	0.11±0.03 (n=3)	4 ⁶ (0.30 nM) ^a [n=2] 4 ⁷ (0.08 nM) ^b [n=1]

Values are means ± standard deviation of independent experiments. ND indicates no data.

^{a,b} The values were determined by the standard curve of the OD value versus rBoPrP concentration in Fig. 4G

^c The value at 4⁶-fold was 2.3 times less than that for ELISA, because the samples for FCCS were diluted 2.3-fold (350 µl/150 µl) compare to ELISA.

3) Qdot を用いた場合の FCCS の検出限界値 (緩衝液中)

Qdot をプローブとして用いた場合の FCCS の検出限界値を検討した。検出対象は rBoPrP とし、緩衝液中 (PBS、pH7.3) での検出を試みた。検出には、44B1-Alexa488 (0.22 nM) と 72-Qdot655 (0.27 nM) の組み合わせを用いた。

0.23 nM rBoPrP での相互相関関数の振幅値を比較した場合、プローブとして Qdot を用いた場合は Alexa を用いた場合の約 5 倍の振幅値だった (図 1)。検出限界値は、Qdot655 を用いた場合 0.029 ± 0 nM (n=3) だった (図 1)。比較のために、44B1-Alexa488 と 72-Alexa647、72-Alexa488 と 44B1-Alexa647 を用いて行ったところ、検出感度はそれぞれ 0.37 ± 0.49 nM (n=3)、 0.19 ± 0.23 nM (n=3) だった (図 1)。

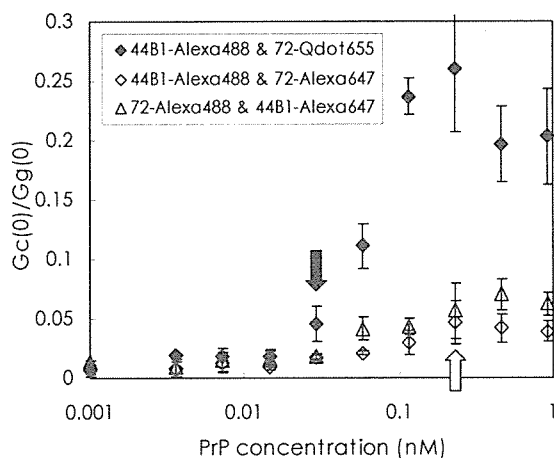


図1 検出感度の比較

D. 考察

前回の牛脳抽出液での実験で確認されたのと同様、プリオン感染マウスからの抽出液にも FCCS 測定に影響をあたえる夾雑物が存在することが分かった。牛脳抽出液での実験と同様、遠心操作を加えることによりそれが軽減できることが分かった。必要な遠心操作の時間は 3 分であり、検査の簡略さを損なうものではないと考える。

フレライザ BSE のプロトコルでは検体希釈液を 2 倍量加えるが、この条件では FCCS の感度が良くないことが分かった。ELISA を用いた検出では、抗原抗体反応が固層で進行し、その後反応プレートを洗浄する。一方、FCCS を

用いた検出では、抗原抗体反応は液層で進行し、反応プレートは洗浄しない。したがっておそらくは、抗原抗体反応に及ぼす尿素の影響と測定に及ぼす夾雑物による散乱の影響のため感度低下を引き起こしたと考える。この問題に対して、FCCS を用いて検出する際には抽出液に検体希釈液を 6 倍量加え (ELISA は 2 倍量)、尿素と夾雑物の濃度を低下させることを試みた。その結果、フレライザ BSE と同程度の感度を実現できた。検出できた PrP の濃度は 0.13 nM であり、前回報告した緩衝液中および牛脳抽出液中での rBoPrP の検出限界値と一致し、検出限界値に矛盾がないことが示された。

FCCS 測定では、通常 2 つの波長で 2 つの蛍光分子を励起し、2 つの検出器で受けた 2 つのゆらぎの相互相関を評価する。相互相関関数の振幅は、2 つの蛍光分子の相関に比例するが、2 つの共焦点領域の重なり程度にも規定される。したがって、2 つのレーザー光の光軸合わせと観察領域を規定するピンホール合わせに気を配り、2 つの共焦点領域を一致させねばならない。

今回新たにプローブとして用いた Qdot は、近年注目されている新しい蛍光プローブであり、高輝度、光安定性など優れた光学特性を有している。加えて、短波長領域に吸収域をもつため、一波長励起多波長発光が可能となる。したがって、今回用いた Qdot655 と Alexa488 の組み合わせに対しても、1 つのレーザーのみを用いた一波長励起 (473 nm) が可能となる。これにより、レーザー光の光軸のズレによって生じる相互相関関数の振幅の減弱が改善され、S/N が高くなることが期待できる。加えて、Qdot 一分子あたりに多分子の抗体を融合させることが可能となるため、PrP に対する一分子のプローブあたりの親和性が増し、検出感度の向上が期待される。

Qdot と Alexa を用いた場合のそれぞれの相互相関関数の振幅値を比較すると、予想通り Qdot を用いた場合の振幅値が高かった。これによって、検出限界値付近の値の判別がより適切に行えた。Qdot には Fab が 4 分子結合していると推測される。したがって、今回の Qdot を用いた場合の検出感度の向上は、PrP に対する一 Qdot あたりの親和性が Alexa を用いた場合よりも高かったためと推測する。しかし、今

回用いた Qdot と抗体の結合法では抗体を還元するため、結合させた抗体一分子あたりの親和性が低下しているかもしれない。その懸念を払拭するため、現在完全型抗体と Qdot の結合法を検討している。

加えて、Qdot を用いることによって光源を 1 つにできるため、装置の簡素化・低額化が可能となり、より検査場に適した小型・安価な装置の製造が期待できる。

今後は、Qdot への抗体の結合法の検討とプリオン感染牛からの PrP^{Sc} 検出を試みたい。

E. 結 論

FCCS を用いてプリオン感染マウスから PrP^{Sc} を検出可能であることが分かった。このときの FCCS の検出感度は、BSE 検査用 ELISA と同程度であった。プローブとして Qdot を用いた場合、装置の簡素化が図れることが分かった。このときの検出感度は、プローブとして Alexa を用いた場合よりも高いことが分かった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y, Kinjo M: Control of the optical properties of quantum dots by surface coating with calix[n]arene carboxylic acids. *J Am Chem Soc* 128(29): 9288-9289, 2006.
- 2) Ohsugi Y, Saito K, Tamura M, Kinjo M: Lateral Mobility of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J* 91: 3456-3464, 2006.
- 3) Kawai-Noma S, Ayano S, Pack C-G, Kinjo M, Yoshida M, Yasuda K, Taguchi H: Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes to Cells* 11: 1085-1096, 2006.
- 4) Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A: A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol* 30: 577-581, 2006.
- 5) Nomura Y, Fuchigami H, Kii H, Feng Z, Nakamura T, Kinjo M: Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Biochem* 350: 196-201, 2006.

- 6) Mikuni S, Tamura M, Kinjo M: Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Lett*, 581: 389-393, 2007.

2. 学会発表

- 1) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M: Detection of prion protein immune complex using Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. 生物物理学会支部会(札幌) 2006.3.
- 2) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M: Detection of prion protein immune complex using Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. 第44回年会 日本生物物理学会・第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議(沖縄県宜野湾市) 2006.11.

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

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

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 採材時凍結していた野外発生例の脳幹部と死後変化により腐敗していた確定検査材料（延髄門部）、さらに BSE 脳内接種発症牛の脳幹部と脊髄のホルマリン固定ギ酸処理されたパラフィン包埋組織（PET）を用いて、BSE 診断に有用な抗体の選別、死後変化や凍結の影響について検討した。PET ブロット法での蛋白分解酵素処理を二段階の温度で行うとともに、C 末端領域を認識する抗体を用いることにより、凍結や死後変化に関係なく安定的かつ効果的に異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）陽性シグナルを検出できるようになった。BSE 感染牛の不明な点、すなわち特定危険部位以外での PrP^{Sc} 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

牛海綿状脳症（BSE）診断を高度化するため、ホルマリン固定パラフィン包埋材料（PET）を用いて非定型例ならびに若齢例のほか海綿状変性がなく免疫組織化学的に異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）が検出できない症例、ならびに特定危険部位以外での PrP^{Sc} 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。

平成 18 年度は PET ブロット法で BSE 診断に有用な抗体の選別、死後変化や凍結の影響について検討した。

B. 研究方法

採材時凍結していた野外発生例（国内 15、17、29 例目）の脳幹部、死後 1 日（国内 28、29 例目）および 2 日（国内 30 例目）を経過して採材された延髄門部、さらに BSE 脳内接種発症牛の脳幹部と脊髄のホルマリン固定ギ酸処理パラフィン切片を用いた。

また、免疫組織化学的染色では脱水系列（エタノール、メタノール）によりシグナル強度が異なることから、BSE 脳内接種発症牛の第 13 胸髄の隣接組織をホルマリン固定ギ酸処理後、エタノールとメタノール系列でそれぞれ脱水し、パラフィン包埋した。

約 4 μm 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。切片を載せた膜を 100 μg/ml あるいは 250 μg/ml のプロテイナーゼ K（PK）で 37°C もしくは 55°C で処理した後、3M グアニジンチオシアン酸塩で室温 10 分間処理した。

一次抗体には抗マウスプリオン蛋白質モノクローナル抗体 T1、T2（動衛研・田川上席研究員作成）、44B1、43C5、SAF32、SAF54、SAF84 の各抗体を用い、0.03～0.05 μg/ml の濃度で室温、1 時間反応させた。二次抗体として発光法にはヒストファイン・シンプルステイン MAX-PO（M）（ニチレイ）を、発色法にはヒストファイン・シンプルステイン AP-M（ニチレイ）をそれぞれ 500 倍希釈して室温 30 分間反応させた。

C. 研究結果

1) パラフィン包埋法の脱水処理

BSE 脳内接種発症牛の第 13 胸髄ホルマリン固定ギ酸処理後、メタノール系とエタノール系による比較を行なった。PET ブロット法では、灰白質部位のみで強陽性シグナルが検出され、脱水系の違いによる感度の差はなかった（図 1）。

2) PK 処理法

PK 濃度を 100 μg/ml あるいは 250 μg/ml で原法に従い 55°C で一晩消化して検討したところ、

PK 濃度の違いによるシグナル強度に差はなく、むしろ免疫染色の結果と比較すると感度は低下していた。そこで処理時間を 37°C と 55°C でそれぞれ 30 分、1、2、4、6 時間で検討したところ、30 分処理の方が感度が高かった。さらに PK 処理温度を段階的に 37°C 5 分 + 55°C 25 分、37°C 10 分 + 55°C 20 分、37°C 15 分 + 55°C 15 分、37°C 20 分 + 55°C 10 分、37°C 25 分 + 55°C 5 分と行なったところ、37°C や 55°C で処理した場合より感度が増大した (図 2)。

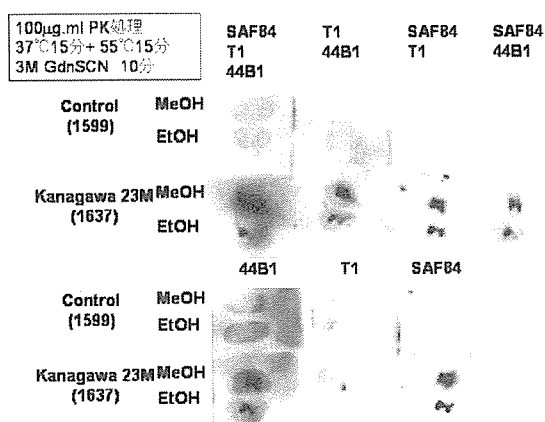


図 1. 脱水剤による反応性の比較

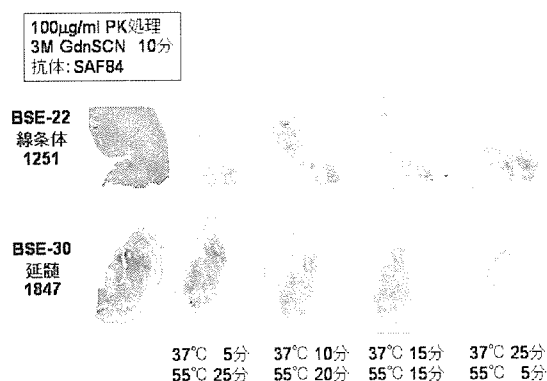


図 2. PK 処理温度と処理時間の比較

3) 抗体

7 種類の抗体を用いて反応性を検討したところ、C 末端側を認識する抗体 (44B1、43C5、SAF84) ほど PET プロットでは陽性シグナルが検出できた (図 3)。また、凍結により氷晶がある組織 (国内 15、17、29 例目)、および死後変化が顕著な例 (国内 28、29 例目) でも強い陽性シグナルが検出できた (図 4)。

D. 考 察

パラフィンは水と相溶性がないため、包埋に先立ち水分除去、すなわち脱水処理を行わなくてはならない。脱水剤には通常、メタノールあるいはエタノールが使用されるが、メタノールはエタノールに比較して 30~40% くらい脱水力が強い。このためウシなど大きな組織のパラフィン包埋法にはメタノール脱水が適している。

加えて、免疫組織化学的染色で PrPSc を検出する場合、化学的修飾、酵素処理、加熱処理あるいはこれらの組み合わせた抗原賦活化が必要となる。最近開発された過マンガン酸カリウムと水酸化ナトリウムによる化学的修飾法による抗原賦活化法は非特異的背景染色が少なく、短時間で前処理が終了するものの、使用できる抗体が限定されるとともに、シラン被覆スライドガラスを用いても剥離しやすいという欠点がある。さらにこの前処置法で

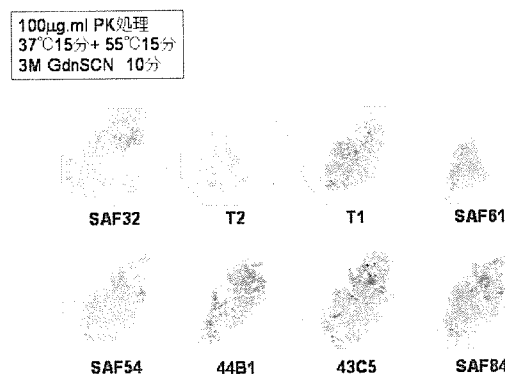


図 3. 各種抗体による反応性の比較 (国内 30 例目 延髄門部)

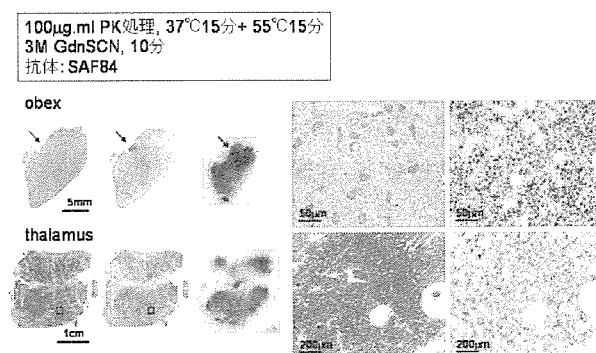


図 4. 二次的変化による反応性 (国内 29 例目)

PrP^{Sc}の検出を行なうと、脱水剤によりPrP^{Sc}のシグナル強度が異なることが判明した。こうしたことから脱水剤の違いによりPETブロット法でもシグナル強度に差異が生じる可能性を検討したが、今回の結果からはPET作成時の脱水剤による影響はなかった。

PETブロット法ではPrP^CをPK消化することでPK抵抗性のPrP^{res}を検出する手法である。原法では250 µg/mlの濃度で55°C一晩(16時間)かけてPrP^Cを消化している。スクレイピーマウス脳では原法のPK消化法でもPrP^{res}が検出できたが、BSE脳ではIHCの結果と比較すると、明らかに陽性シグナルが減弱した。また免疫組織化学的染色でPK消化を行なう場合、通常10 µg/mlの濃度で室温あるいは37°Cで10分間の処理を行う。そこでPK濃度のみならず消化時間についても再検討を加えたところ、BSE脳では原法よりもPK濃度を低く抑えるとともに、反応温度を37°Cから55°Cに二段階にして消化効率を上げかつ短時間でPrP^Cを消化することにより、免疫組織化学的染色とほぼ同じ程度のシグナル検出が可能となった。以上のことから、PrP^{BSE}のPK抵抗性はスクレイピーPrP^{res}よりも低いと推察された。

各種パネル抗体を用いて、PrP^{BSE}検出のためのPETブロット法の至適抗体を検討したところ、C末端側を認識する抗体(44B1、43C5、SAF84)ほどPETブロットでは陽性シグナルが強く、N末端側を認識する抗体ほどシグナルが弱く、オクタリピート部を認識するSAF32抗体には反応しなかった。これはPrP^{BSE}のPK抵抗性が低いこと、PK消化切断部位がスクレイピープリオンと比較してよりC末端側に存在することなどに起因すると考えられた。

IHC検索に際してBSEプリオンは変敗や凍結などの二次的変化を受けても、容易に検出できることが報告されている。今回、PETブロット法についても検討したところ、免疫組織化学的染色同様に二次的障害の有無に関わらず強い陽性シグナルが検出できたことから、死後変化を受けやすい下部消化管や血液含量の多い脾臓などの検索には、免疫組織化学的染色よりも適している可能性が考えられた。

E. 結 論

PETブロット法でのBSE牛のPrP^{Sc}検出には、C末端側を認識する抗体が有用であり、死後変化や凍結などに影響されずに強い陽性シグナルが検出できた。

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

なし

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 プリオン病研究チーム

研究協力者 吉岡 都 (動衛研・安全性研究チーム)

横山 隆 (動衛研・プリオン病研究チーム)

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^{Sc}) 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 PrP^{Sc} 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^{Sc} 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。昨年度、PrP^C の非特異的凝集体 (PrP^{C-res}) が増幅反応中に形成されることを明らかにしたが、本年度は PrP^{C-res} 形成を抑制できる増幅方法を開発した。ジギトニンを緩衝液に添加することにより、PrP^{C-res} 形成が抑制され、マウス PrP^{Sc} の高効率増幅が可能になった。ウシでも PrP^{C-res} の形成はジギトニンにより抑制されたが、PrP^{Sc} の増幅効率はマウスと比べて低く、効率的なウシ PrP^{Sc} の増幅にはさらなる改良が必要である。

A. 研究目的

異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を試験管内で増幅する方法、protein misfolding cyclic amplification (PMCA) 法はハムスタースクレイピー PrP^{Sc} の増幅には極めて有効である。PMCA 増幅を繰り返すことにより PrP^{Sc} の超高感度検出が可能であり、感染ハムスターの血液・尿からも PrP^{Sc} が検出できることが示されている。しかしながら、ハムスター以外の動物種由来の PrP^{Sc} の高効率増幅はこれまで困難であった。本研究の目的は、BSE 由来 PrP^{Sc} の至適増幅条件を明らかにし、BSE 検査法、早期診断法として実用化を図ることにある。本年度は、PMCA 増幅の障害になっている点をマウスを用いて解析し、マウス PrP^{Sc} の増幅に適した方法を開発した。

B. 研究方法

1) PMCA

0.5% TritonX100-4 mM EDTA-PBS を用いてマウス正常脳乳剤を作成し遠心後、その上清を PrP^C ソースとして用いた。マウススクレイピー株、Chandler 感染脳乳剤 (10%) は、 $5 \times 10^{-2} \sim 10^{-8}$ になるよう PrP^C ソースと混合・希釈し、増幅反応を行った。BSE (英国由来) 感染脳乳剤 (10%) は、 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ の比率で PrP^C ソース

と混合し、増幅を行った。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 5 回発振した後、37°C で 30 分インキュベートし、これを 1 サイクルとして 80 サイクルの増幅反応を行った。

2) 増幅条件の検討

上記抽出用緩衝液に種々の界面活性剤を添加し、増幅効率を検討した。増幅産物は PK 消化後、HRP 標識 T2 抗体を用いてウェスタンブロット (WB) 法で検出した。

C. 研究結果

1) マウス PrP^{Sc} の PMCA 増幅結果

従来の緩衝液を用いると、マウス正常脳乳剤を 37°C で攪拌・インキュベートするだけで、PK 抵抗性の PrP (PrP^{C-res}) が産生された (図 1a)。従来の条件下で増幅を行うと、PrP^{C-res} が高いバックグラウンドになり、増幅の有無の判定が困難であった (図 1b)。脂質可溶化剤としてジギトニンを緩衝液に加え PMCA 増幅を行うと、PrP^{C-res} が消失し、 10^{-4} 希釈のサンプルからも増幅が確認できた。増幅産物を正常脳乳剤で 1/10 に希釈し、PMCA 増幅を繰り返す Sequential PMCA を行うと、3 回の増幅により、 10^{-8} 希釈サンプルからも増幅産物を確認できた (図 1c)。

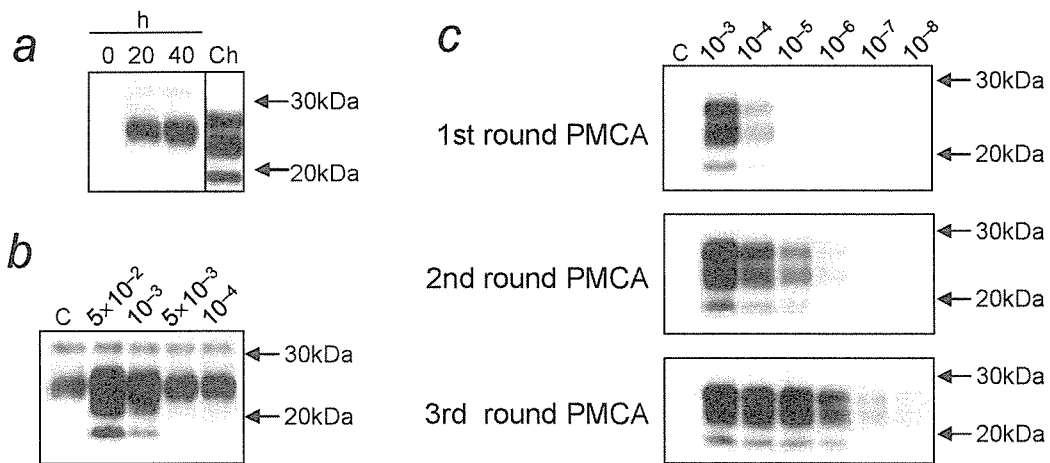


図 1. (a) PrP^{C-res} の形成. PrP^C ソースのみを 20~40 時間インキュベートした. Ch は Chandler 感染脳乳剤の結果を示す. (b) 従来法による PMCA 増幅の結果. C は PrP^C ソースのみを用いて増幅した結果を示す. (c) ジギトニン-PMCA 法による Sequential PMCA の結果.

2) ウシ PrP^{Sc} の PMCA 増幅結果

昨年度報告したように、ウシ脳乳剤をインキュベートするとマウスと同様、PrP^{C-res} が形成される。ウシ PrP^{Sc} の増幅にジギトニン-PMCA 法を応用した結果を図 2 に示す。ジギトニン添加により、PrP^{C-res} 形成は抑制され、10⁻³ 希釈サンプルからシグナルが検出可能となった。しかしながら図 1 で示したマウスの場合と異なり、PMCA 増幅を 3 回繰り返しても顕著なシグナルの増強は認められなかった。

D. 考 察

PrP^{C-res} 形成は、マウス、ウシだけでなく、シカ、霊長類でも観察される。ハムスター PrP^C にはこの傾向は低い、ウシでは特にこの PrP^{C-res} 形成能が高く、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換が阻害されている可能性が考えられた。PrP^{C-res} 凝集体の形成は温度依存性であり、4°C では全く形成されないが、PMCA 反応も生じない。高効率な増幅には、非特異的な PrP^{C-res} 形成と PrP^{res} 増幅反応を分離する必要があった。

この問題を解決する一つの方法は、界面活性剤を用いて PrP^{C-res} を可溶化する事である。プリオンタンパク質は GPI アンカーを持ち、細胞膜上のリポドラフトに局在している。TritonX-100 のような非イオン性界面活性剤を用いると、マウス PrP^C は完全には可溶化されず、コレステロールなど膜構成成分と結合したまま、不溶性になると考えられる。マウスではこの不溶性凝集物がインキュベーション中に

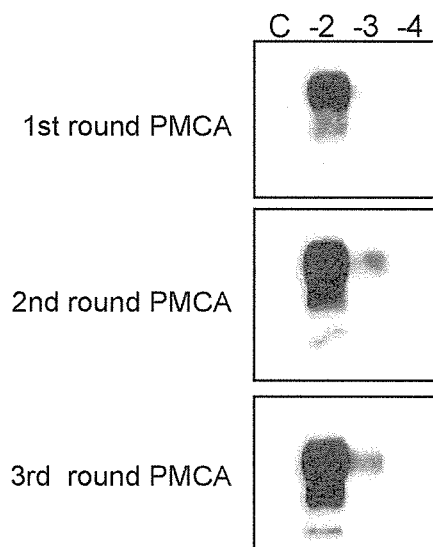


図 2. ウシ PrP^{Sc} の Sequential PMCA の結果.

形成されやすく、PrP^{C-res} 形成の一因となっている可能性が考えられた。

そこで、脂質可溶化剤としてジギトニンを加えて、増幅したところ、PrP^{C-res} 形成はほぼ完全に抑制され、マウスでは、高感度検出が可能になった。一方、ウシでは、PMCA 増幅を繰り返しても、PrP^{res} シグナルの増強は認められず、他の要因も関与していることが示唆された。ウシ PrP^{Sc} を増幅する際、インキュベーション時間はマウスより長くする必要があった。このことは、現状の増幅方法では、ウシ PrP^{Sc} の指数関数的増幅が達成されていないことを示唆しており、効率的なウシ PrP^{Sc} の増幅にはさらなる改良が必要である。

E. 結 論

マウス、ウシなどでは、超音波処理と独立して PrP^C の凝結・凝集が進行し、PrP^{C-res} が形成されるため、PrP^{Sc} の PMCA 増幅が阻害されることが考えられた。PrP^{C-res} 形成をジギトニンで抑制することによりマウス PrP^{Sc} の高感度検出が可能になった。一方、BSE 由来 PrP^{Sc} では、通常の WB と比べて 100 倍程度、検出感度が改善された。

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 Microbiol* 101: 369-376, 2006.
- 2) Murayama Y, Yoshioka M, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Sudo T, Sato K, Shinagawa M, Mohri S: Protein misfolding cyclic amplification as a rapid test for assessment of prion inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 758-762, 2006.
- 3) Murayama Y, Yoshioka M, Yokoyama T, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Yoshida S, Mohri S: Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein. *Neurosci Lett*, 413: 270-273, 2007.
- 4) 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. *J Appl Microbiol* 102: 509-515, 2007.
- 5) 村山裕一: 増殖するタンパク質、プリオン。「遺伝子の窓から見た動物たち」、京都大学学術出版会、pp. 47-56 (2006).

2. 学会発表

- 1) 村山裕一: PMCA 法によるハムスタープリオンの増幅. 2006 年プリオン研究会 (安比高原) 2006.9.

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

研究協力者 舩甚賢太郎、岩丸祥史、今村守一、岡田洋之、毛利資郎
(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^{Sc})の性状の解析を行った。初代からBSEプリオンが伝達可能な動物(tga20,MHM2)ではBSEと類似した糖鎖型のPrP^{Sc}が検出された。一方、マウスで1代継代したBSEを接種したTgHaNSE,MH2Mの脳からは、蛋白質分解酵素処理後にヘテロな断片を示すPrP^{Sc}が検出された。

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、我が国を含めた各国で非定型BSEの発生が報告されており、BSEプリオンが複数の株に分かれる可能性も示唆されている。我が国のBSE症例のうちBSE/8/Fukushima(非定型)、BSE/9/Fukuyama(若齢型)は固相酵素免疫測定法(ELISA)の吸光度も低く、ウエスタンブロット(WB)でのプロテイナーゼK(PK)抵抗性プリオン蛋白質(PrPres)の蓄積量も少なかった。プリオンの性状解析には、増幅が必要であったため、ウシ型PrP過発現マウス(TgBoPrP)を用いて両症例のプリオンの増幅を試みた。また、新たな非定型症例(BSE/24)について、野生型マウス、TgBoPrPおよびウシへの伝達試験を行い、その性状解析を試みる。本課題は、非定型BSEのリスク評価を行うための基礎的な知見を提供する。

BSEプリオンはヒトも含めて、マウス、ヒツジ、サルなど広範な動物種への伝達性が認められているが、ハムスターへの伝達性は示されていない。そこで、マウスおよびハムスターのキメラプリオン蛋白質

(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。BSEのヒトへのリスクを考えるためにも、種の壁のメカニズム解明が必要である。

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^{Sc})の有無を検討する。

Table 1. Summary of unusual and suspended BSE cases in Japan

case	age of cattle	ELISA ¹	WB	IHC	Spongiform changes	Remarks
BSE/8/Fukushima ²	23 months	0.23 ± 0.05	+	-	-	atypical BSE
BSE/9/Fukuyama ²	23 months	0.28 ± 0.03	+	-	-	young BSE
Suspended/Kanagawa ³	20 years	0.38 ± 0.09	±	-	-	
BSE/6/Wakayama	83 months	3.32 ± 0.2	+	+	+	typical

1, optical density (O.D.) value of TeSeE (Plateria BSE kit, Bio-Rad)

2, Yamakawa et al., 2003

3, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/03/h0327-2.html> (in Japanese)

4, Iwata et al., 2006

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^{Sc} 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) TgBoPrP を用いた BSE/8/Fukushima, BSE/9/Fukuyama の伝達試験は、現在 2 代目の伝達試験を実施中である。同マウスを用いた定型 BSE プリオンの希釈試験では、英国の BSE 脳試料の感染価は $10^{6.7} ID_{50}/g$ であった。また、10%脳乳剤を 20 μ l 脳内接種する際の定型 BSE プリオンの検出限界は、 $10^{2.7} ID_{50}/g$ であった。

Table 2. Transmission of BSE to TgBoPrP

Inoculum	No. diseased ¹ /no. inoculated	mean \pm SE or sacrificed days
Titration assay of typical BSE		
ori	6/6	217.8 \pm 3.8)
-1	6/6	257 \pm 2.6
-2	6/6	309 \pm 53.4
-3	6/6	386 \pm 13.9
-4	3/6	479 \pm 131.0
-5	0/6	>495
Transmission study of Japanese BSE cases		
BSE/8/Fukushima ²		
Primary passage	0/5	(600, 786, 788, 788, 860)
2nd passage	0/7	>550
BSE/9/Fukuyama ³		
Primary passage	0/6	(505, 577, 704, 881, 927, 927)
2nd passage	0/7	>495
Suspended/Kanagawa ⁴	0/7	(717, 811, 831, 864, 864, 892, 927)
PBS	0/5	(432, 475, 534, 609, 717)
BSE/6/Wakayama ⁵	5/5	277.2 \pm 12.2

All mice were tested for PrP^{Sc} accumulation in the brain by western blotting, and mice that were positive were considered to be diseased

1. BSE sample obtained from the UK. Infectivity titer per gram was $10^{6.7}$

2. case of atypical BSE in a 23-month-old Holstein steer

3. case of BSE in a 21-month-old Holstein steer

4. BSE diagnosis suspended in a 20-year-old Japanese black cow. The faint unusual PK resistant PrP band was observed by using WB, but no spongiform change or no PrP deposition were detected in pathology

5. case of typical BSE in a 83-month-old Holstein cow

BSE/24/Sasebo の材料については、マウス、トランスジェニックマウス、ウシへの脳内接種を行っており、経過観察中である。

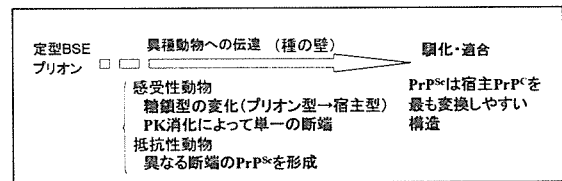
2) マウスおよびハムスターのキメラ PrP を発現する MH2M, MHM2 での伝達試験の結果、tga20, MHM2, ICR マウスは初代の BSE プリオンに感受性を示し (感受性動物と区分)、MH2M, TgHaNSE マウスは抵抗性を示した (抵抗性動物と区分)。このことから、BSE プリオンの初代での伝達性は PrP131-188 に含ま

れる I139L, Y155N, S170N のアミノ酸置換の関与が示唆された。野生型マウスで 1 代継代すると BSE プリオンは抵抗性動物にも伝達が認められた。この抵抗性動物に蓄積する PrP^{Sc} の性状解明が、種の壁のメカニズムを明らかにする上で重要と考えられる。蛋白質分解酵素処理した PrP^{Sc} (PrP^{Core}) の糖鎖型および分子量を WB により比較した。すべてのマウスに蓄積した PrP^{Core} は N 末側を認識する抗体 (B103) では BSE 型を示したが、C 末側を認識する抗体 (44B1) との反応では、抵抗性動物の PrP^{Core} には BSE 型とは異なる糖鎖型、分子量の断片が検出された。感受性動物には均一な PrP^{Sc} が蓄積しているが、抵抗性動物ではヘテロな PrP^{Sc} が混在していると考えられた。

D. 考察

我が国での 8, 9 例目の BSE の牛型 PrP 発現マウス (TgBoPrP) での伝達試験では 2 代目までの継代を行っているが、伝達性は確認されていない。5%脳乳剤を用いた場合の TgBoPrP マウスの検出限界は $10^3 ID_{50}/g$ であり、これ以下のプリオンの存在は否定できない。

BSE プリオンを異種動物へ伝達するときの馴化の過程で、感受性動物 (初代から伝達が可能な動物種) では、馴化にともなって糖鎖型がプリオン株の特徴から宿主の特徴を含めたものへと漸次変化していくが、BSE プリオンの PrP^{Core} の N 末端は均一であると考えられた。一方、抵抗性動物では PK 消化で異なる断端を示す PrP^{Sc} が検出され、抵抗性動物の脳内にはヘテロな PrP^{Sc} が混在していることが示唆された。



種の壁のモデル

E. 結論

TgBoPrP を使った脳内接種試験での定型 BSE プリオンの検出感度は $10^{2.7} ID_{50}/g$ であることが示された。非定型 BSE の伝達性は、現在まで認められていない。異種動物へのプリオンの伝達に際しては、PK 処理により異なる断端

を形成するヘテロな PrP^{Sc} が蓄積していることが示された。

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, Yokoyama T, Sudo T, Sato K, Shinagawa M, Mohri S: Protein misfolding cyclic amplification as a rapid test for assessment of prion inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 348: 758-762, 2006.
- 2) Yokoyama T, Shimada K, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, Kimura KM, Itohara S, Shinagawa M: Both host prion protein 131-188 subregion and prion strain characteristics regulate glycoform of PrP^{Sc}. *Arch Virol*, 152: 603-609, 2007
- 3) 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. *J Appl Microbiol* 136: 9-17, 2007.
- 4) Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Shinagawa M, Kitani H: Immortalized cell lines from cryopreserved fetal bovine brain tissues. *Cell Biol Int* 31: 57-64, 2007.
- 5) Iwamaru Y, Takenouchi T, Ogihara K., Hoshino M, Takata M, Imamura M, Tagawa Y, Hayashi-K H, Ushiki-K Y, Shimizu Y, Okada H, Shinagawa M, Kitani H, Yokoyama T: Microglial cell line established from prion protein overexpressing mice is susceptible to various murine prion strains. *J Virol* 81: 1524-1527, 2007.
- 6) Miyamoto K, Shimamoto T, Aosasa M, Kimura S, Nakamura N, Okubo Y, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H: Development of recombinant chicken IgY from single chain fragment of variable region for diagnosis of BSE. *Biologicals*. (in press)

2. 学会発表

- 1) Yokoyama T, et al.: Alteration in the biological characteristics of BSE prion monitored by their incubation period in transgenic mice. *NeuroPrion*, October 2006, Italy.
- 2) Yokoyama T: Biological characteristics and species barrier of BSE prion. BSE seminar – towards the control of prion diseases – , October 2006, Tokyo.

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

8. BSE 感染動物における感染・発症機構の解明

—各種実験動物への伝達性、BSE 表現型実験動物の探索—

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学 病態獣医学講座 教授

研究協力者 横山雄市 (帯広大・病態獣医)
堀内基広 (北大・プリオン病学)
山河芳夫 (感染研・細胞化学)
佐多徹太郎 (感染研・病理)

研究要旨 ScrapieY5 を対照に BSE の各種実験動物への伝達を試みた。マウス、スナネズミ、およびモルモットに伝達可能であった。このうち、BSE 初代接種モルモットはマウスに比較して早期の発症がみられ BSE に比較的感受性が高いことが明らかとなった。これら、伝達可能であった動物のうち、マウス、モルモットの初代接種例では脾臓およびリンパ節にプリオンの蓄積がみられなかったが、スナネズミでは陽性を示した。また、マウス、モルモットの二代目動物では潜伏期の短縮とともに、脾臓あるいはリンパ節に陽性を示した。このことは、脾臓やリンパ節への感受性は BSE プリオンやその継代株の性状に一義的にはならず、動物種あるいは遺伝的背景の異なる系統との“組合せ”によることを示唆するように考えられた。また、本研究では BSE の病態を反映する動物種については見出せなかったが、現在経過観察中の動物種での検索、馴化株での経口接種等によりモデル動物での BSE の病理発生機序について今後も検索していく予定である。

A. 研究目的

スクレイピープリオンは、マウスをはじめハムスター、ラット、スナネズミ等の実験動物への伝達性が確認されている。BSE プリオンについては肉骨粉による自然感染と実験感染の結果からその宿主域が霊長類、偶蹄目、さらには猫科動物と広範囲にわたることが知られているが、実験動物への伝達性については Tg あるいは knock-in マウスを含むマウスでの報告が主たるもので、スクレイピープリオンのような種々の実験動物への伝達性についてはほとんど報告がないのが現状である。

スクレイピー感染羊や慢性消耗病 (CWD) 罹患シカ類と BSE 感染牛のプリオンの体内分布には大きな違いがみられる。前二者が脾臓、扁桃、リンパ節に蓄積がみられるのに対して、後者ではこれら部位に蓄積はみられない。実験的に BSE プリオンを羊に接種した場合、PrP 遺伝子型 *ARR/ARR* をもつ羊は経口感染では抵抗性を有することが知られ、また、脳内接種を行った場合、感染は成立するものの、脾臓をは

じめとするリンパ組織にはプリオンの蓄積がみられないことが報告されている。一方、これら以外の PrP 遺伝子型を有する羊では、脳内、静脈内および経口接種のいずれのルートからの感染によっても脾臓、扁桃、リンパ節に蓄積がみられる。また、BSE プリオンのブタへの伝達性試験では、経口接種では発症がみられないが、脳内接種では発症するというように、感受性は有するものの、感染ルートによって伝達性に違いがみられる。さらに、非経口接種により感染したブタではリンパ節、扁桃、脾臓には感染性がないことが報告されている。このことは、スクレイピー感染羊や CWD 感染シカ類と BSE 感染牛のプリオン体内分布の違いが、BSE プリオンの性状に起因すると考えるよりも、宿主側に一次的要因があると考えのほうが理解しやすい。また、このような脾臓、リンパ節への蓄積がみられないことが、ブタや PrP 遺伝子型 *ARR/ARR* をもつ羊が BSE プリオンの経口接種に際して抵抗性を有する理由とも推察されているが、その機序については不明である。

そこで、本研究では種々の実験動物における伝達性と、いわゆる BSE 表現型実験動物の探索を目的として、スクレイピープリオンを対照として、BSE プリオンの脳内接種を実施した。感染動物については脾臓、リンパ節におけるプリオンの蓄積状況について検討を行うとともに、濾胞樹状細胞 (FDC) および樹状細胞 (DC) を行った。

B. 研究方法

羊スクレイピー (Y5) およびと畜場で摘発された BSE (KUS) の 10%脳乳剤をマウス (ICR、クレア、♀、4 週齢)、スナネズミ (MGS/Sea、九動、♀、6 週齢)、モルモット (Hartley、SLC、♀、3 週齢)、ハムスター (Syrian、SLC、♀、3 週齢)、ラット (Wistar、クレア、♀、3 週齢) およびユーラシアハタネズミ (日本獣医生命科学大学菅原盛幸先生より分与、♀、12-28 週齢) に脳内接種を行い、これらを初代動物とした (表 1)。これら動物が臨床症状を示し、かつ終末期に至るまで観察を行い、解剖を行った。これら発症動物の脳組織については同様に脳乳剤を作製し、継代を行い二代目動物とした。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脳および脾臓を凍結した。

表 1

	動物種	結果	初代潜伏期
Scrapie (Y5)	mouse	発症	387±4
	golden hamster	発症せず	-
	guinea pig	観察中	
	rat	観察中	
	mongolian gerbil	発症	732±18
	common vole	観察中	
BSE (KU)	mouse	発症	456±27
	golden hamster	発症せず	
	guinea pig	発症	366±33
	rat	観察中	
	mongolian gerbil	発症	785±35
	common vole	観察中	

表 2

		Scrapie(Y5)		BSE(KUS)	
		spleen	Lymph node	spleen	Lymph node
mouse	1st	+	+	-	-
	2nd	+	N.E.	+	N.E.
gerbil	1st	-	N.E.	+	+
guinea pig	1st	/	/	-	-
	2nd	/	/	-	+

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、HE 染色、および 135°C オートクレーブ 20 分 (135DWHA 法) の前処理後、抗プリオン抗体として B103、43C5、T1、110 抗体を用いて免疫組織化学的染色を実施した。また、FDC の検索のために S100α (JIMRO)、DC の検索のために S100β (JIMRO)、Fascin1 (Santa Cruz) による染色を行った。また、これら免疫染色の対照標本として、スクレイピー帯広株接種マウス (末期)、健常羊 (2 歳、6 歳いずれも♀)、スクレイピー自然発症羊例 (6 歳、♀) および実験感染例 (8 歳、♀)、健常牛 (1 歳および 2 歳、♀) および本邦発生 BSE (KUS) のそれぞれ脾臓、リンパ節、扁桃のパラフィン標本を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

各種実験動物の伝達性について現在経過観察中のものを含め表 2 にまとめた。スクレイピープリオンの脳内接種ではマウス、スナネズミで伝達が可能であったが、ハムスターには伝達できなかった。また、BSE プリオンについてはマウス、スナネズミ、モルモットに伝達可能であったが、ハムスターでは確認できなかった。前者ではラット、モルモット、およびハタネズミ、後者ではラット、ハタネズミについて現在継続して確認中である。潜伏期間はともに発症がみられたマウスとスナネズミではスクレイピープリオンでよりは早い発症がみられた。また、BSE プリオン接種モルモットでは 330 日程度の潜伏期で発症がみられた。二代目が得られているマウス、モルモットではいずれも潜伏期の短縮がみられている (図 1)。

これら発症動物の脾臓およびリンパ節について抗プリオン抗体による免疫染色を行った結果、対照標本の帯広株接種マウスおよび羊スクレイピーでは脾臓、リンパ節の胚中心に陽性所見がそれぞれ観察された。スクレイピー接種マウスの二代目脾臓の陽性所見は初代マウスに比較して拡大していた。また、スクレイピー接種マウスおよび BSE 接種スナネズミの脾臓、リンパ節においても陽性所見が得られた。しか

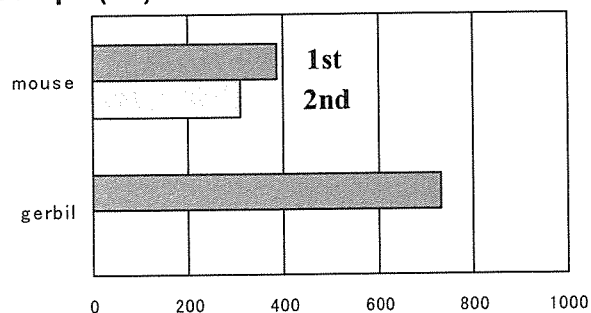
しながら、スクレイピー接種スナネズミ、BSE 接種初代マウスおよび BSE 接種モルモットでは脾臓、リンパ節に蓄積はみられなかった。BSE 接種モルモット二代目では脾臓には蓄積がみられないものの、リンパ節の胚中心に蓄積が観察された (図 2)。

羊スクレイピーではプリオンの蓄積が胚中心に観察されるものの、S100 α 抗体に反応する FDC の分布は、健常羊と同様であり、特に顕著な増加は見られなかった。また、BSE 感染牛と健常牛ではともに、S100 α 抗体に陽性を示す FDC が胚中心に観察された。脾臓、リンパ節ではともに胚中心に陽性が観察されたが、リンパ節で脾臓では濾胞の辺縁部に陽性所見がみられた。これら所見は罹患牛と健常牛では違いがみられなかった。モルモットでは脾臓濾胞およびリンパ節胚中心辺縁部にそれぞれ散在性に観察された (図 2)。

プリオンの蓄積部位に一致して、羊スクレイピーではリンパ節および脾臓に胚中心の形成が観察された。BSE 接種モルモット二代目ではプリオン陽性部位に一致して、胚中心の形成がみられるものの、陰性を示した脾臓では胚中心の形成はみられなかった (図 3)。

宿主側の免疫応答に関する DC 細胞の特定とその反応について検索したが、感染動物と対照動物とに分布違いや数的な異なりは見出せなかった。

Scrapie(Y5)



BSE(KUS)

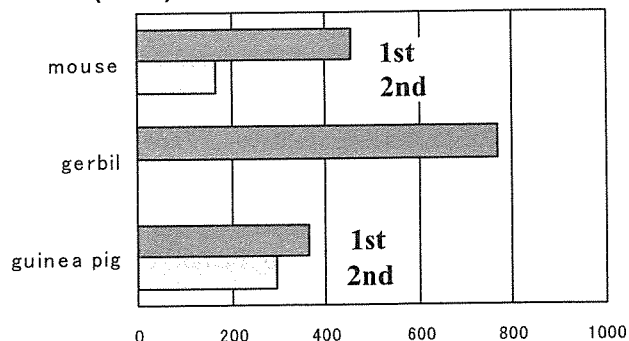


図 1

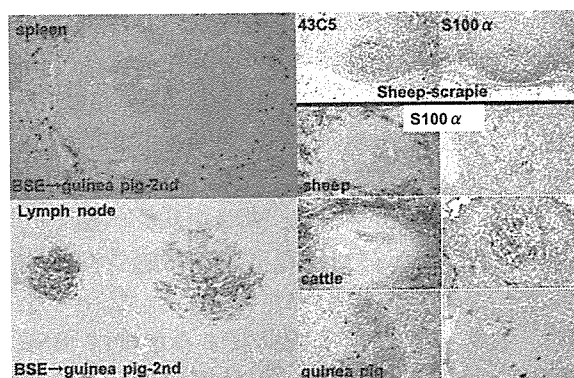


図 2

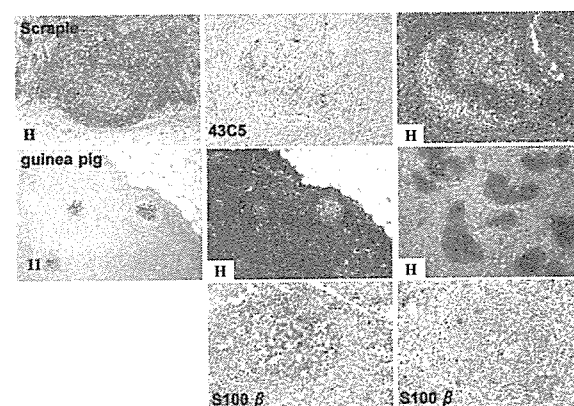


図 3

D. 考 察

今回、ScrapieY5 を対照として、BSE (KUS) の各種実験動物への伝達性を調べた。ハムスターはスクレイピープリオンに感受性であり、BSE プリオンに対して抵抗性であることが知られているが、本研究ではスクレイピープリオンについても発症がみられなかった。スクレイピープリオンのマウスへの伝達に際しても、伝達不可能な株の存在が知られている。このことから今回使用したハムスターの種類とともに、スクレイピーの株に依存する可能性が考えられた。いくつかの動物種については現在経過観察中であるが、BSE (KUS) についてはマウス、スナネズミ、およびモルモットに伝達性を確認することができた。特に、これまでに報告のないモルモットが初代動物で比較的短期間の潜伏期で発症を示し、BSE に高感受性を有することから、現在接種・経過観察中の非定型 BSE 例との潜伏期、病変分布等の比較の上で興味深い動物種であると思われる。

BSE プリオンを牛に接種した場合、脳内接種、経口接種のいずれの感染ルートにおいても

脾臓やリンパ節、あるいは扁桃といった臓器にプリオンの蓄積はみられない。前述したように *ARR/ARR* 遺伝子型を有する羊やブタでは経口接種では感受性を示さず、脳内接種では感受性を示すものの、脾臓やリンパ節では陽性所見がみられないことが示され、脾臓やリンパ節での複製・増殖機構が経口接種における感受性に関与している可能性が示唆されている。しかしながら、このような感受性に関する示唆は BSE では当てはまらず、BSE の病理発生 のより詳細な検索には、BSE の病態を反映するモデル動物が必要と考えられる。今回、脳内接種における病変分布の検索を行ったが、初代動物では脾臓やリンパ節にプリオンの蓄積はみられないものの、二代目には蓄積がみられ、今回発症のみられた動物の中にはいわゆる BSE 表現型動物として有用な動物種は見出せなかった。

ScrapieY5 接種初代マウスでは脾臓およびリンパ節にみられるものの、BSE (KUS) 接種初代マウスでは確認できなかった。潜伏期が ScrapieY5 接種マウスに比較して、BSE (KUS) 接種マウスで長いこと、また、二代目では脾臓に蓄積がみられるとともに、大幅な潜伏期の短縮がみられることは、前述した脾臓およびリンパ節が感受性に寄与するといった示唆に矛盾しないように思われた。一方、マウス継代 BSE 株を接種した VM/Dk (*Sinkp⁷*) マウスに関する報告では、腹腔内接種では脾臓およびリンパ節に蓄積がみられるものの、スクレイピー株接種マウスに比較して後期にみられること、脳内接種マウスでは脾臓、リンパ節にプリオンの蓄積がみられないことが報告されている。このことは、マウス継代 BSE 株においても脾臓、リンパ節はプリオンの複製あるいは増殖の場であるが、高感受性を示さず、明らかマウススクレイピー株とは異なり、感染ルートに依存して脳内接種では下向性に広がらない。つまり、スクレイピーに対して長い潜伏期を示すマウスでは *ARR/ARR* 遺伝子型をもつ羊やブタと類似した特徴を示している。また、BSE を脳内接種した C57/BL6 では 470 日目に脾臓にプリオンの蓄積がみられる (山河先生私信)。本研究で使用した ICR マウスは C57/BL6 と同様にスクレイピーに対して潜伏期の短い遺伝子型を有するマウスであり、このことは、脾臓やリンパ節への感受性は BSE プリオンやその継代株の

性状に一義的にはよらず、動物種あるいは遺伝的背景の異なる系統との“組合せ”によることを示唆するように思われた。本研究で得られたスナネズミの成績もこの推察と矛盾しない。また、*ARR/ARR* 遺伝子型をもつ羊やブタでの馴化 BSE 株での継代成績についての報告はみられないが、本研究のモルモットでの成績はモルモット馴化 BSE 株とモルモットの組合せによりリンパ節が複製・増殖の場となることを意味するのかもしれない。

S100 β による FDC の検索では抗体の種特異性に問題は残りさらなる検討が必要であるが、いずれの動物種においても陽性細胞が確認できた。動物種によりその分布は大きく異なるものの、構造的な特異性は認められなかった。しかしながら、プリオン陽性部位ではいずれも明瞭な胚中心の形成がみられ、かつモルモットの脾臓ではその形成がみられなかった。このことから、胚中心構成細胞がプリオンの複製・増殖の場として重要であることは再認識されたが、BSE の病理発生 の理解には不十分であり、WB でのプリオン蓄積の再確認および馴化株による経口接種等、更なる検討が必要である。

E. 結 論

スクレイピーおよび BSE について各種実験動物への伝達試験を行った。初代接種では脾臓、リンパ節に蓄積がみられない動物種がみられるものの、継代株によりその病態は失われた。動物プリオン病の病態にはプリオンの性状と合わせ、動物種特異的な要因が関与する可能性が示唆されたが、その機序については結論が得られなかった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T: Species-specificity of a Panel of Prion Protein Antibodies for the Immunohistochemical Study of Animal and Human Prion Diseases. *J Comp Pathol* 136: 9-17, 2007.