

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19年度 総括・分担研究報告書 (1)

平成20年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 19 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	北海道大学大学院先端生命科学研究院	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	研究チーム長
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	特別研究員
山本 裕介	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
山河 芳夫	国立感染症研究所 細胞化学部	研 究 官

目 次

分冊（1）

- 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 19 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. プリオン病の病理組織学的診断に関する研究
－高感度病理診断法の開発－・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）
2. 新規トランスジェニックマウス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・・・・・・・・ 17
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・・・・・・・・ 23
分担研究者：金城 政孝（北海道大学大学院先端生命科学研究院・細胞機能科学分野）
5. 新しい方法を用いた病理検査技術の開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
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・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
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
病原・感染研究チーム）
7. 牛海綿状脳症(BSE)プリオンの生物学的性状と「種の壁」のメカニズム解明・・・・・・・・ 35
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	
—各種実験動物への伝達性および中枢神経系の比較病態について—	39
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	45
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	51
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	61
分担研究者：山本 裕介（北海道立畜産試験場・基盤研究部）	
12. プリオンの標的細胞特異性決定機構とプリオン蛋白質の細胞内分解に関する研究	65
分担研究者：堀内 基広（北海道大学大学院獣医学研究科）	
13. 異常型プリオンの免疫系における増殖・伝播機構の研究	71
分担研究者：大西 和夫（国立感染症研究所・免疫部）	
14. BSE リスク解明を目的としたプリオン蛋白構造変換改変による 構造変換機序解析に関する研究	77
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）	
15. サルに伝播された BSE プリオンの生体内分布と生化学的性状の解析	81
分担研究者：山河 芳夫（国立感染症研究所・細胞化学部）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	87

分冊（2）

牛肉の消費に関する意識調査

調査委託 （株）三菱総合研究所

I. 総括研究報告書

平成 19 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、本年度は以下の結果を得た。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行い 10 倍から 100 倍の感度増加がみられた。PET プロット法の改良方法が完成した。小型全自動蛍光相関分光法測定装置で Q-dot を用いることで従来の WB 法と同程度の感度が得られた。PMCA 法でジグトニン法や phase shift 法を用いることにより BSE プリオンの増殖が可能となったが 100 倍程度にとどまった。Tg マウスは 8 系統得られたが、脳内でウシプリオンの発現は見つからなかった。BSE プリオンのハムスターとのキメラマウスへの伝達試験の結果、一部のアミノ酸変異が種の壁への関与することが考えられた。rMP_{PrP} をウシ回腸ループ内に投与し、粘膜固有層のマクロファージの細胞質内に小顆粒状から凝集塊として濾胞間に分布した。プリオン接種マウス脳内に軸索伸長に関わる欠失型 CRM-2 を見いだした。BSE プリオンの脳内接種牛は発症前 8 ヶ月で脳幹部にプリオンを検出できた。2 頭のサルの髄液中の 14-3-3 蛋白はサルの神経症状出現 100 日前から検出できた。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。B 細胞およびマクロファージ前駆細胞株がプリオン蛋白質を発現保持する能力を持っていた。Hsp90 が *in vitro* でプリオンタンパク質の構造変換を促進することを見出し、これを指標にプリオンタンパク質の一次代謝産物、およびプリオンの産生を抑制する化合物を見いだした。BSEJP24（169 ヶ月令の非定型 BSE）の種々の動物への伝達試験はいまだ途中経過であるが、従来 BSE プリオンよりも短い潜伏期間を示している。

分担研究者（計 14 名）：

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 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准教授）

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 研究チーム長）

古岡秀文（国立大学法人帯広畜産大学畜産学部病態獣医学講座病理学分野 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獣医公衆衛生学教授）

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 特別研究員）

山本裕介（北海道立畜産試験場基盤研究部長 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）

山河芳夫（国立感染症研究所細胞化学部 研究官）

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、BSE 発生国は世界で 25 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。2008 年 2 月までの約 6 年 4 ヶ月で 22 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例が見つかり、国内では計34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166例、フランス23例、ほか16例の計205例となったが、最近は減少している。欧米では129コドンがMM型は健康人では37%、sCJDでは64-71%であるのに対し、わが国の健康人では92%でsCJDでは82%を占め、またvCJD発症例では100%である。最近では輸血や血液製剤による人から人への感染例も4例報告され、さらに非発症例ではあるがプリオン遺伝子のMV型にもBSEプリオン沈着が見つかったことから、予想以上の人への感染が危惧され、わが国でも「食の安全」問題として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少なくなく、食品安全対策を検討するうえで困難を来している。そこで、異常プリオンタンパク質(プリオン)の高感度検査法の開発を行うとともに、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。

また、わが国で摘発された非定型例は前述した2例であるが、2006年3月の佐世保例では食肉衛生検査所の協力のもと、脳組織他の採材が可能であったので、非定型例の詳細な性状解析が可能となった。そのため、生化学的性状の解析および動物への接種実験を行うことになった。従来型のBSE(BSE-C)に対し、非定型BSEではプリオンの斑状沈着があるので、Bovine amyloidotic spongiform encephalopathy (BASE)とされ、世界でおおよそ30頭弱が発見されている。コア蛋白の分子量が低いBASE-Lと高いBASE-Hの二種に分類されている。2008年1月30日のJournal of Virology (Kong Q et al.: Evaluation of the Human Transmission Risk of an Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy Prion Strain. J. Virol. doi:10.1128/JVI.02561-07)では、BASEはTgマウスでの潜伏期間が短いことから、ヒトに対してより強毒である高い可能性が報告された。また米国例では遺伝子異常

(E211K)も報告された。

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。平成18年度末で、3)および4)が終了したので、平成19年度は1), 2), 5)の3点の研究、および6)牛肉の消費に関する意識調査を行った。

1) 最新のBSE診断および検査技術に関する研究: 全頭検査で非定型例や若齢例など病理・免疫組織化学的に診断しえない例があり、また特定危険部位以外でのプリオンの存在を調べるため、免疫組織化学の高感度化(佐多)およびPETプロット法(岡田)を応用する。スクリーニング検査には現在ELISA法が使われているが、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(山本)、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) 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、山本、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。

4) 牛肉の消費に関する意識調査：BSE のリスクに対する現在の国民の認知や意識等を把握するとともに、不安要素の解明及びそれを解決するための方法について検討する。

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 プロット、蛍光法、*in vitro* 増殖系、トランスジェニックマウス開発と解析を、技術基盤の構築と精度・感度の検討し改良する。BSE 確認検査で判明した BSE 陽性牛を積極的に調べる。

2) BSE リスクの解明に関する研究：a) *in vivo*；この実験は時間を要するので、伝達実験、動物の解析、プリオンの性状解析を継続し、「種の壁」機構の解明と進め、同時に研究資源化し分担研究者等の研究に役立てていく。マウス、ヒツジ、ヤギ等の腸管ループを用いたプリオンの取り込みについて、FDC と神経系との関係について検索を進める。実験感染マウスの免疫担当細胞の分画精製とプリオン発現解析の結果、細胞移入系を作成し、プリオン維持細胞培養系実験系の開発と解析を進めていく。ウシやサルへの伝達実験では、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、ウエスタンプ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阻害物質の解析を繰り返す、プリオン持続感染細胞で解析を進展させる。

3) 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。

4) 牛肉の消費に関する意識調査：牛肉の信頼に関する既存の主な意識調査の状況を確認し、BSE リスクに関する意識調査をヒアリングや訪問調査等で行う。

(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。もっとも良い条件で ELISA を行うと、常法に比べ、Fab'-AT 標識抗体では 100 倍の感度上昇が得られた。細胞を用いた免疫組織化学では現行法に比較すると 16 倍にしかならず、その原因の究明に取り組んでいる。PET プロット法をさらに改良した。蛋白分解酵素処理を二段階の温度で行うこと、クエン酸緩衝液でオートクレーブ処理、さらに 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。蛍光発光法を用いる新規方法は、十分な変性操作を行い、化学結合で固相化し検出するものであるが、マウスの検体では WB 法と同等の感度を得たが、ウシ検体ではシグナルは著しく減弱した。前処理法の改善が必要であろう。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、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 10 倍の高感度化をはかることができ、ほぼ WB 法の感度をえた。PMCA 法の改良と最適化を継続している。本年度はジグトニン法および新規の phase shift 法を用い、スクレイピー感染リスザルや BSE 感染カニクイサル脳組織で検討したが、プリオンの増幅効率は 100 倍程度で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 8

系統作成したが、脳内のウシプリオン蛋白質の優位な発現は認められなかった。

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/JP8 (茨城非定型) および若齢 BSE/JP9 では、結果として伝達は成功しなかった。またマウスおよびハムスターのキメラ TG マウスへの伝達試験および TG マウスへの BSE プリオン伝達試験から 3 アミノ酸が種の壁に関係することが判明した。BSE プリオンをマウス、スナネズミ、モルモット、ハムスター、ラットおよびアルメニアンハムスターに接種し、スクレイピーと比較した。モルモットは BSE と類似する病態を示し、BSE プリオンに感受性が高いことが明らかとなった。ウシ回腸ループに rMP_{PrP} を投与し取込状況を調べた。rMP_{PrP} は回腸ドームや絨毛から取り込まれ濾胞間を移行した。取り込んだ細胞はマクロファージで、小顆粒から凝集塊となった。マクロファージではライソゾームに局在したが、プロテオゾーム阻害剤で分解が抑制された。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神経軸索伸長制御因子(CRMP-2)のプロセッシングに関わる知見をえたので、初代培養系細胞で発現させた結果、神経突起の長さには影響がなかったが、神経突起の分岐が優位に増加していた。免疫系細胞に標識プリオン遺伝子を導入した。プロ B 細胞とマクロファージの前駆細胞にプリオン蛋白質の高発現と保持が認められたが、FDC 様細胞には見られなかった。BSE 脳内接種牛のうち早期の病態を検討した。脳内接種後 10 ヶ月 (臨床症状発現 8 ヶ月前) に脳幹に微量を、12 ヶ月で視床、小脳、脳幹にプリオンが検出できた。BSE プリオン接種後のサルは、接種後 26 ヶ月後から神経症状が出現した。脳内に多くのプリオンが検出され、しかも vCJD にみられる Florid plaque と類似する所見をえた。髄液の 14-3-3 蛋白は神経症状出現前 100 日で検出され増加した。脳の WB 法による検討では BSE と類似する糖鎖型が検出された。また末梢神経および一部の顎下リンパ節にも微量のプリオンが検出された。脾臓や扁桃などのリンパ組織には検出できなかった。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。成長ホルモン関連遺伝子群の変化が認められた。Hsp90 が *in vitro* でプリオンタンパク質の構造変換を促進することを見出し、細胞膜上に局在した。これを指標にプリオンタンパク質の一次代謝産物、およびプリオンの産生を抑制する化合物を見いだした。

3) 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。いまだ実験中ではあるが、現在までに得られた結果は下記の通りである。グアニジン感受性や分子量は典型的 BSE とは異なる。WB 法では L 型に近いがイタリア例とは異なっていた。近交系マウスの脳内接種では 400 日の時点で発症していないが、牛型 PrP 発現 Tg マウスでは典型的 BSE よりやや短い 200 日前後に発症し、さらに継代中である。牛型 PrP 発現 Tg マウスの FDC アッセイでは 75 日後に脾臓への伝達性を確認した。小動物のうちハタネズミでは比較的短い潜伏期で発症する可能性があると思われるが観察継続中である。計 9 頭のウシ脳内接種実験では約 11 ヶ月で金属音に対する過剰反応や運動障害などの臨床症状が出現しており経過観察中である。

4) 牛肉の消費に関する意識調査：BSE に対する意識としては、2001 年の発生直後には「自分にどのような影響があるかわからない」、「原因が不明である」という点から不安感が高まったものの、現在は不安を感じていないとする傾向が見られた。説明を行ったところ、対策に理解を示し賛同が得られる傾向が見られた。なお、詳細な報告書は分冊とした。

D. 考 察

1) 最新の BSE 診断および検査技術に関する研究：高感度免疫組織化学法の確立にむけた基礎検討がほぼ終了した。ELISA 系では 100 倍程度の高感度化が可能であったが、BSE 例では一桁程度の増加にとどまった。安定した高感度な PET プロット法が確立できたが、総合的

な感度上昇は得られていない。ほか FCCS や PMCA 法でも進歩がみられたが、残念ながら二桁程度で WB 法と同程度であった。現在の WB 法はかなり高感度であり、それに合わせるには 1000 倍以上の高感度化が必要で、さらに工夫が必要である。今後は BSE や BASE 実験感染例での病態検討に伴って開発を進めていくことになろう。

2) BSE リスクの解明に関する研究：昨年度発症が確認された牛やサルの解析が進んだ。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感染実験や病態解析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 の実験でもユニークな研究結果が得られ、今後の展開が期待できる。

3) 佐世保非定型 BSE 例に関わる研究：潜伏期間が短いことが特徴である可能性があるが、今後の伝達試験結果により詳細があきらかとなろう。

4) 牛肉の消費に関する意識調査：今後の情報提供の内容として、専門的な内容をわかりやすく解説した情報提供を望む意見が多く得られ、不安要素の解決のために専門家の説明が重要である点が示唆された。

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) 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。また牛肉の消費に関する意識調査を行った。

F. 健康危険情報

特になし。

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. プリオン病の病理組織学的診断に関する研究 —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、佐藤 由子（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）の高感度化を目的に開発している immunoAT-tailing（IAT）法において、抗体に標識する oligo(dA-dT）（AT）の数、鎖長を検討した。標識数については1分子のIgGに30塩基長のATが平均3.0と1.7分子標識されたものを用いて細胞標本における免疫染色で比較検討した結果、後者が優れていることが判った。鎖長は15～50塩基長のbiotin化ATをstreptavidin固相マイクロプレートへ固相化し、酵素反応を行って評価した。その結果では15塩基のものがdigoxigeninの取り込みが最も悪く、20,30,40塩基は同程度であった。しかし、15,20,30塩基のAT標識ウサギFab'抗マウスIgGを調製し、マウスIgG固相マイクロプレートを用いてELISAを行うと、15塩基標識のものがS/N比、検出感度ともに最も良好であり、その検出限界は間接法の100倍優れていた。そこで、細胞標本におけるβ-カテニンの免疫染色において、15塩基のAT標識Fab'を用いたIAT法とデキストランポリマー（DP）法との検出感度比較を行った結果、IAT法がDP法より16倍高感度であった。BSE病理標本におけるIAT法のIHCへの応用については、既報のような優れた染色性の再現が得られず、その原因究明に取り組んでいる。

A. 研究目的

BSE確定診断のための免疫組織化学（IHC）では、ABC法、デキストランポリマー（DP）法が採用されている。しかし、これらはウエスタンブロット解析に比べて検出感度が劣ることが指摘されている。そこで、IHCの検出感度向上を目指して新しいシグナル増幅法：immunoAT-tailing（IAT）法の開発に取り組んでいる。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。また、oligo(dA-dT）（AT）標識抗体の精製条件と物性評価法を確立した。今年度は抗体に標識するATの数、鎖長の最適条件を決定し、BSE病理標本におけるIAT法のIHCへの応用評価を行った。

B. 研究方法

1) IgG-AT30の調製とその評価

ウサギ抗マウスIgGはTraut's試薬で還元し、

簡易ゲル濾過により精製した。また、5'アミノ化30塩基長のATはsulfo-SMCCと反応させてマレイミド化し、簡易ゲル濾過により精製した。そして、IgG：AT=1:20（モル比）で混和し、4℃一晩反応させた。30塩基のAT標識IgG（IgG-AT30）はゲル濾過（HPLC）でピーク前半と後半に分けてプールした（図1）。それぞれのプールの260nmと280nmの吸光度を測定し、A260/280比に基づくAT/IgGモル比の標準線にプロットして1分子のIgGに対する標識ATの平均分子数を推定した。

2つのIgG-ATプールのIAT法における差異を確認するため、細胞標本における免疫染色比較を行った。Vero細胞をホルマリン固定、Triton-X100で浸透処理した後、5ng/mLのマウス抗GM130モノクローナル抗体を37℃1時間、250ng/mLの抗マウスIgG-AT30を37℃30分間反応させた後、ジゴキシゲニン（dig）標識dUTP存在下でDNAポリメラーゼ（Klenow fragment、

exo-) による DNA 伸長反応を 37°C2 時間行った。発色は 80ng/mL 希釈した POD 標識マウス抗 dig モノクローナル抗体を 37°C30 分間反応させ、DAB により行った。

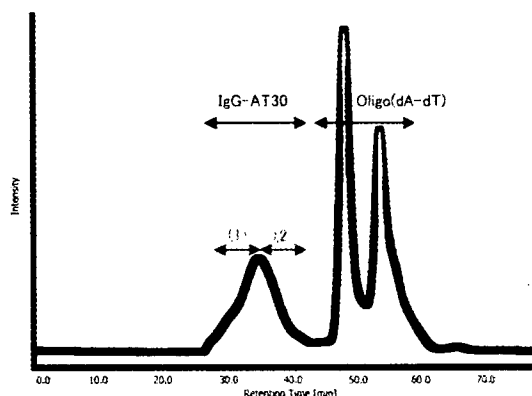


図1 Oligo(dA-dT)標識数の異なる IgG-AT30 の分取

2) AT 鎖長の検討

鎖長 (15,20,25,30,40,50 塩基) の異なる 5' ビオチン化 AT を合成し、0.05% Tween20 加 PBS (PBST) で 10 倍希釈列を作製した。市販のストレプトアビジン (SA) 固相 96 ウェルプレートにビオチン化 AT を入れて室温 30 分間反応させた。PBST で 5 回、PBS で 1 回ウェルを洗浄した後、dig 標識 dUTP 存在下で酵素反応を行った。PBST で 5 回ウェルを洗浄した後、PBST で 1:5,000 倍希釈した POD 標識抗 dig 抗体を 37°C30 分間反応させた。PBST で 5 回ウェルを洗浄し、TMB を加えて室温暗所 5 分間静置した後、2N 硫酸で発色反応を停止した。評価は 450nm の吸光度測定により行った。

3) Fab' -AT15,20,30 の調製と ELISA

ウサギ F(ab')₂ 抗マウス IgG を 2-MEA で還元し、簡易ゲル濾過により Fab' を精製した。また、マレイミド化 AT は前述の方法で調製した。Fab' とマレイミド化 AT は 1:5 (モル比) で混和して 4°C 一晩反応させ、ゲル濾過 (HPLC) により Fab' -AT を精製した。

AT 鎖長の異なる Fab' -AT による IAT 法の検出感度を比較するため、10 倍希釈列のマウス IgG を 96 ウェルプレートに固相化し、3% スキムミルクで 37°C1 時間ブロッキングした後、PBST で 500ng/mL に調製した Fab' -AT を 37°C30 分間反応させた。PBST で 5 回、PBS で 1 回ウェルを洗浄し、その後の酵素反応から評価ま

では前述の方法により行った。

4) Fab' -AT12,15,18 の調製とその評価

Fab' -AT の調製と細胞標本の調製は前述の方法により行った。IAT 法による免疫染色における鎖長の影響を調べるため、5ng/mL のマウス抗 GM130 モノクローナル抗体を 37°C1 時間、400ng/mL または 50ng/mL の抗マウス Fab' -AT を 37°C30 分間反応させた。酵素反応から発色までは前述と同様に行った。

5) 免疫染色における IAT 法と従来法の比較

細胞標本における IAT 法と DP 法との検出感度を比較するため、Vero 細胞を 2 倍希釈列のマウス抗 β-カテニンモノクローナル抗体 (125ng/mL ~ 1.95ng/mL) を 37°C1 時間、250ng/mL 希釈したウサギ Fab' -AT15 抗マウス IgG を 37°C30 分間反応させた。酵素反応から発色までは前述の方法により行った。DP 法には DAKO 社の Envision+ を使用した。また、細胞核はヘマトキシリンで染色した。

6) ドットプロット解析

親水化した PVDF 膜に 10 倍希釈列のマウス抗 PrP モノクローナル抗体 : B04 (2ng, 200pg, 20pg) をドットプロットした。0.5% BSA-PBST で 37°C1 時間ブロッキングした後、PBST で 500ng/mL に調製したウサギ IgG-AT15 抗マウス IgG またはウサギ Fab' -AT15 抗マウス IgG を 37°C30 分間反応させた。PBST で 5 分間 3 回洗浄、PBS で平衡化した後、dig 標識 dUTP 存在下で酵素反応を 37°C2 時間行った。PBST で 5 分間 3 回洗浄した後、TMB (メンブレン用) で発色させた。

(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) AT 標識数の異なる抗体の評価

AT を抗体一分子に複数標識したい場合、IgG は SH 基の導入において F(ab')₂ や Fab' よりも有利である。しかし、調製時の AT 標識数の

制御は困難であったため、ゲル濾過精製時に IgG-AT30 を画分 1 (図 1 (1)) と画分 2 (図 1 (2)) とに分取した。画分 1 の IgG : AT=1 : 3.0、画分 2 のそれは 1 : 1.7 であった。

これらの IgG-AT30 を用いた Vero 細胞のゴルジ体染色の結果は図 2 に示す。(1) は画分 1 の IgG-AT30 によるもので、核近傍にあるゴルジ体は弱く染まっている。(2) は画分 2 の IgG-AT30 によるもので、ゴルジ体は強く染まっている。このことから AT 標識数が多ければ検出感度が落ちる、即ち、AT の伸長効率は低下することが明らかになった。

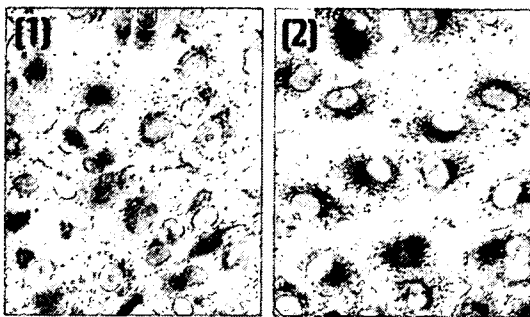


図 2 Oligo(dA-dT) 標識数の異なる IgG-AT30 を用いた
ゴルジ体染色

2) AT 鎖長の検討

AT はセルフアニーリングにより自己鎖内に鑄型領域とプライマー領域を形成する。このセルフアニーリングとその後の伸長反応を効率よく行わせるには、ある程度の鎖長が必要である。この鎖長を検討するための評価系を単純化するため、SA 固相 96 ウェルプレートに 10 倍希釈列の鎖長の異なる 6 つのビオチン化 AT を固定し、AT の伸長度を dig の取り込みで評価した (図 3)。15 塩基 (AT15) は dig の取り込みが最も悪く、唯一 1pM で NC に比べて有意な dig の取り込みを認めた。20, 25, 30 塩基間では明らかな差異を認めず、また、10fM まで有意な dig の取り込みを認めた。鎖長の最も長い 50 塩基 (AT50) は、20~30 塩基に比べて dig の取り込みが劣った。そこで、15, 20, 30 塩基の AT 標識抗体を調製して、マウス IgG を抗原とする ELISA でさらに検討を行った。

3) 鎖長の異なる Fab' -AT の比較(1)

還元したウサギ Fab' には SH 基は一つである。そのため、Fab' -AT における Fab' :

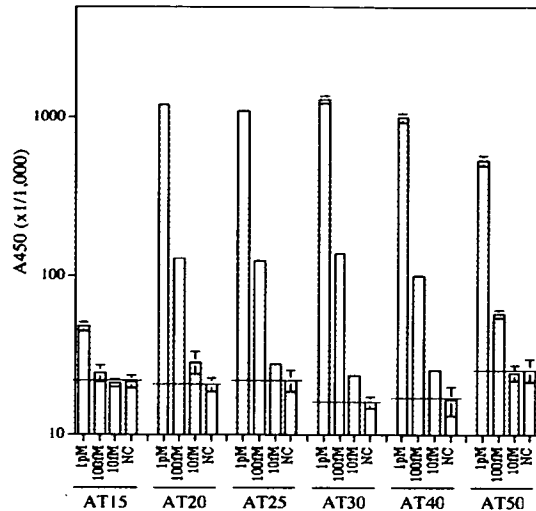


図 3 鎖長の異なる oligo(dA-dT) の伸長効率比較 (N=3)

AT=1 : 1 の均一な標識抗体を調製できる。そこで、Fab' に 15, 20, 30 塩基の AT を標識し、抗原抗体反応に及ぼす鎖長の影響を ELISA で検討した (図 4)。図中の Cont. ではウサギ Fab' -AT 抗マウス IgG の代わりに POD 標識ウサギ IgG 抗マウス IgG を用いた。図 3 の結果より至適鎖長と思われた 20, 30 塩基の AT を標識した Fab' -AT20 と Fab' -AT30 はバックグラウンドが高く、検出限界はいずれもマウス IgG=100pg/mL であった。一方、Fab' -AT15 では Cont. 同様にバックグラウンドが低く、検出限界はマウス IgG=10pg/mL であった。なお、Cont. の検出限界はマウス IgG=1ng/mL に止まった。

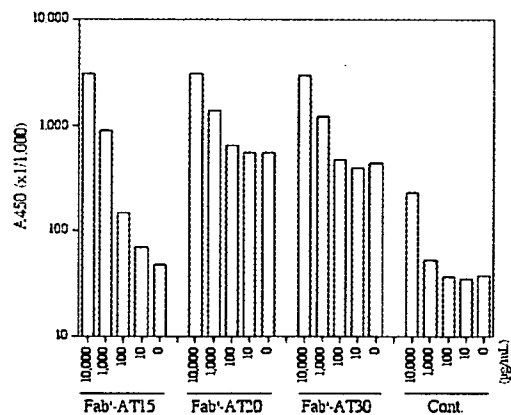


図 4 鎖長の異なる Fab' -AT による ELISA (N=2)

4) 鎖長の異なる Fab' -AT の比較(2)

Fab' へ標識する AT の最適鎖長を絞り込むため、12, 15, 18 塩基の Fab' -AT を調製して細

胞標本における免疫染色により評価を行った (図 5)。この場合も特異性と感度が最も良好であったのは Fab' -AT15 で、50ng/mL の Fab' -AT15 でもゴルジ体は明瞭に染色された。一方、Fab' -AT12 は Fab' -AT15 に比べて感度が劣り、Fab' -AT18 は特異性が他に比べて明らかに劣った。

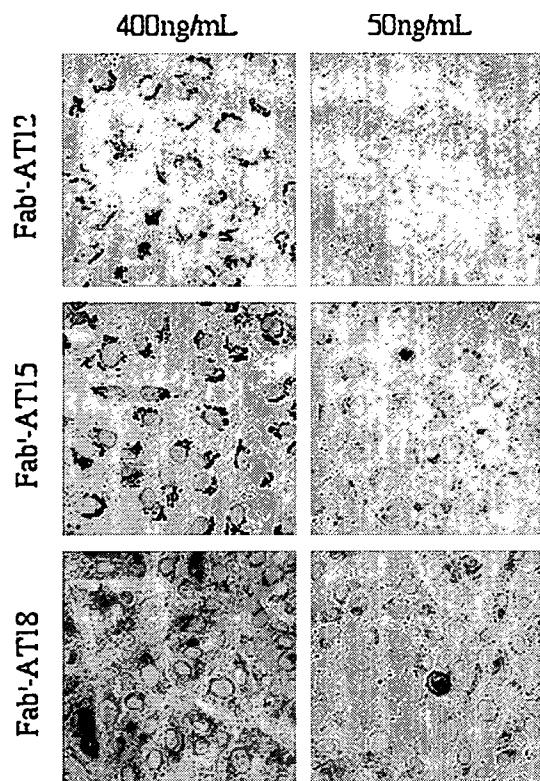


図 5 鎖長の異なる Fab' -AT によるゴルジ体の免疫染色比較

5) 細胞標本の免疫染色における IAT 法と DP 法の感度比較

これまで Vero 細胞のゴルジ体を標的とする免疫染色によって IAT 法の評価を行ってきた。そのため、その他の構造タンパク質においても IAT 法が有効であるか否かについては不明であった。そこで、新たに β -カテニンを標的として IAT 法の評価を行った (図 6)。図中の比は一次抗体の希釈倍率を意味する。それぞれ 3 つの希釈列を示したが、IAT 法は DP 法と比べて相対的に 1/16 の一次抗体濃度で同じ染色強度が得られた。

6) B04 抗体と AT 標識抗体の反応性

BSE 病理標本における IHC ~ IAT 法を応用するために、これまで同様に一次抗体として

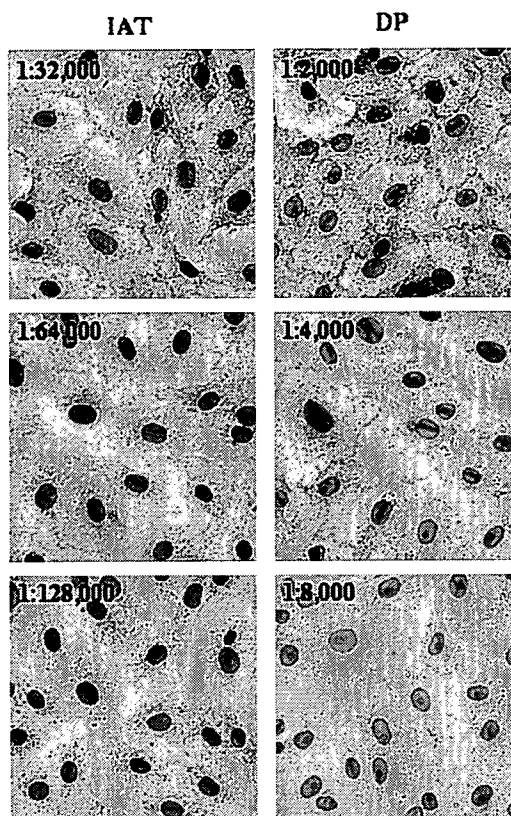


図 6 β -カテニンの免疫染色における IAT 法と DP 法との比較

BO4 抗体を使用した。しかし、DP 法に比べて感度ははるかに劣った。その原因を組織標本上で検討すると、BO4 抗体にウサギ Fab' -AT 抗マウス IgG が反応していない可能性が疑われた。そこで、BO4 抗体を PVDF 膜へドットブロットし、Fab' -AT15 と IgG-AT15 の反応性を IAT 法で検討した。図 7 はその結果であり、何れの場合も 200pg までの BO4 抗体が検出できている。反応性は保持していることが確認された。

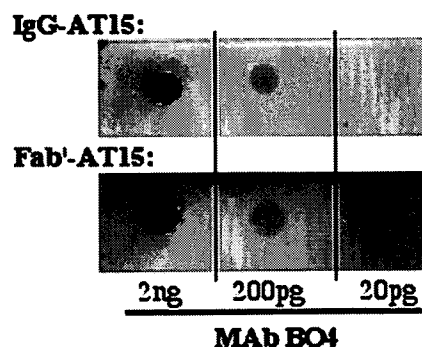


図 7 B04 抗体とウサギ AT 標識抗体抗マウス抗体との反応性

D. 考 察

IAT 法は AT が DNA ポリメラーゼで伸長される過程でハプテン (dig) が取り込まれる。そして、その取り込まれたハプテンの数によって検出感度が決定される。従って、短時間でより長鎖の AT が生成される改良を行えば、所期の目標感度に近づくと考えられる。そこで、本年度は 1 分子の抗体に対する AT 標識数の差異、鎖長の差異が IAT 法の検出感度に及ぼす影響について検討した。

標識数の異なる IgG-AT を用いた Vero 細胞のゴルジ体に対する免疫染色では AT 標識数の多いもので検出感度が劣った。これは同一の抗体に標識された AT 同士がアニーリングしてセルフアニーリングとそれに続く伸長反応 (テイリング反応) が阻害されているためと推察される。経験的にウサギ Fab' -AT (Fab' :AT=1:1) が IgG-AT よりも IAT 法に適していると感じていたが、この結果はそれを支持するデータのの一つと思われる。

AT の鎖長についてはビオチン化 AT を用いた検討、Fab' -AT による ELISA、Fab' -AT による Vero 細胞のゴルジ体に対する免疫染色評価により行った。それらの結果をまとめると、鎖長が長い (50 塩基) と近隣の AT 同士がアニーリングしてテイリング反応が阻害される。鎖長が長いとマイクロプレートウェルや細胞に非特異吸着し、S/N 比が低下する。これはわずか 3 塩基の差 (15 塩基対 18 塩基) でも顕著に認められた。一方、鎖長が短い (12 塩基) とセルフアニーリング効率が悪く、テイリング反応が進まないと推定された。結果的に当初より採用している 15 塩基が IAT 法に最適な鎖長であると判断した。なお、図 4 は Fab' -AT15 による IAT 法に基づく ELISA が間接抗体法に比べて 100 倍高感度であることを示しているが、これは細胞標本における免疫染色においても間接抗体法に比べて同程度の感度差を確認した (データ未収載)。

Vero 細胞における β -カテニンの免疫染色において、IAT 法と DP 法を比較すると IAT 法が 16 倍高感度であった。そこで、最適化した IAT 法を BSE 病理標本における IHC へ応用するための検討を行っている。しかし、DP 法に比べて検出感度が劣る、あるいは DP 法で染色される条件で IAT 法では染色できない問題に直面

した。組織切片上では B04 抗体にウサギ Fab' -AT 抗マウス IgG が反応していないことが示唆されたので、2 種の AT 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体を再調製し、B04 抗体との反応性はドットプロットにより確認した (図 7)。それらは B04 抗体と反応したことから、BSE 病理標本における IHC へ応用について再検討を行っている。一方、DP 法に比べて感度が劣るのは B04 抗体特有の現象である可能性も考えられる。そのため、B04 抗体以外のマウス抗 PrP モノクローナル抗体による IAT 法を用いた IHC の検討、ウサギ抗 PrP 抗体を一次抗体とする IAT 法を用いた IHC の検討を進めていく必要を考えている。

E. 結 論

IAT 法に適した抗体に標識する oligo(dA-dT) の鎖長と 1 分子の抗体当たりの標識 oligo(dA-dT) 数は、近傍の oligo(dA-dT) 同士が干渉しない要件を満たす必要がある。これらを満たす抗体としてウサギ Fab' -AT15 を選抜した。そして細胞標本では IAT 法の検出感度は DP 法の最大 16 倍高感度であった。BSE 病理標本における IHC では IAT 法が DP 法に比べて劣っており、IHC における IAT 法の最適化を進める必要がある。

F. 健康危険情報 特になし。

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 新規のウシプリオン単独発現トランスジェニック(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ことを目的に、マウスプリオンプロモーター領域の解析を行い、このプロモーターを用いたウシプリオンタンパク質発現用トランスジーンをマウス受精卵に顕微注入し、新たなウシプリオン TG マウス 8 系統を作出した。しかし、TG マウス脳におけるウシプリオンタンパク質の明確な発現は認められず、マウスプリオンプロモーターを利用して TG マウス個体での発現を制御させるには、トランスジーン構築の改良が必要と考えられた。

A. 研究目的

現在、BSE 由来組織中の異常型プリオンの量・プロテイナーゼ K 抵抗性と病原性との関連に関する知見は必ずしも充分ではなく、異常型プリオンの病原性を早期に評価できる新規のモデル動物系の開発が望まれている。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トランスジェニック(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、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行い、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、受精卵への顕微注入により、新規の TG マウスを作製した。

B. 研究方法

1) TG マウスの作製と PCR 判定

昨年度までのマウスプリオンプロモーター領域の *in vitro* における解析結果より、マウス

プリオンプロモーターとして、神経系細胞株 N2a など高いプロモーター活性を示したプリオン遺伝子上流域 3.6kbp を用い、ウシプリオン cDNA 0.8kbp と hGH 遺伝子断片 2.0kbp を組み込んだトランスジーンのアpaI-NotI フラグメント約 6.5kbp 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、一次スクリーニングとしてウシプリオン cDNA の一部を PCR にて特異的に増幅することで判定し、陽性個体について二次スクリーニングとして、マウスプロモーター領域を含むトランスジーンの前半部分の PCR 増幅と、ヒト GH 遺伝子を含むトランスジーンの後半部分の PCR 増幅によって判定した (図 1)。二次スクリーニングで陽性と判定された個体について、C57BL/6J マウスと交配することで TG マウス子孫を得て系統化した。

2) TG マウス脳のウシプリオンタンパク質発現解析

TG マウスの脳蛋白質におけるウシプリオン蛋白質の有無を Western Blot により調べた。

脳サンプルは予め RNALater (Ambion 社) に浸漬して 4℃ 保存してあったものを使用した (ただし、陽性コントロールの #39 は RNALater で -80℃ 保存してあったもの)。各個体の脳組織 10~20mg に蛋白分解酵素阻害剤 (Complete, EDTA 不含, Roche 社) を加え

た T-PER 組織タンパク質抽出試薬 (Pierce 社) を約 20 倍量加え、ビーズ式ホモゲナイザ (TissueLyzer, Qiagen) にてホモゲナイズ後、遠沈し、上清を得た。蛋白質濃度を Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen) による蛍光染色法で測定し、常法に従い SDS 処理ののち、NuPAGE10%ゲルと MES バッファ (Invitrogen) により電気泳動を行った。1 レーンあたりのタンパク量は約 20 μ g とした。泳動後 PVDF 膜 (Pall 社) へ転写し、SyproRuby Blot stain (Invitrogen) にて膜へ転写された蛋白質の状態を確認したのち (図 2 左), 免疫染色を以下の条件で行った (図 2 右)。

一次抗体: Abcam 社 抗牛プリオン・マウスモノクローナル抗体[WD3C7] (最終濃度:1.2 μ g/ml)

二次抗体: ECL キットに付属の HRP ラベルの抗マウス IgG 抗体 (10,000 倍希釈)

視覚化: 化学発光法 (ECLplus, GE Healthcare 社)

(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。

C. 研究結果、考察

マウスプリオンプロモーターを用いたウシプリオン TG マウス用トランスジーンを顕微注入したマウス前核期胚 457 個を 16 匹の偽妊娠マウスに移植し、119 匹(26.0%)の離乳仔を得た。このうち PCR 一次スクリーニングで 13 匹が陽性、PCR 二次スクリーニングでは 11 匹 (9.2%)が TG 陽性と判定された (図 1.)。この 11 匹をファウンダーマウスとして C57BL/6J マウスと交配させたところ 8 系統(6.7%)について TG 子孫が得られ系統化した。これら 8 系統の TG マウス脳についてウシプリオンタンパク質を認識するがマウスプリオン質は認識しない抗体を用いた Western Blot 解析を行ったが、陽性コントロールに存在する特異バンドは認められず、ウシプリオンタンパク質の明確な発現は確認できなかった (図 2 右)。今回用いたトランスジーン of 細胞へのトランスフェクションでは発現が確認されているに

もかかわらず、TG 個体では中枢神経系での期待される発現が認められなかった。理由は不明であるが、今回用いたトランスジーン構築では、個体レベルでは発現が抑制されており、マウスプリオンプロモーターを利用した TG 作製には遺伝子構築について、プロモーター領域の再検討も含め、個体での発現を確実にするための改良が必要と考えられた。

D. 結論

新規のウシプリオン単独発現トランスジェニック(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ことを目的に、マウスプリオンプロモーター領域の解析を行い、このプロモーターを用いたウシプリオンタンパク質発現用トランスジーンをマウス受精卵に顕微注入し、新たなウシプリオン TG マウス 8 系統を作出した。しかし、TG マウス脳におけるウシプリオンタンパク質の明確な発現は認められず、マウスプリオンプロモーターを利用して TG マウス個体での発現を制御させるには、トランスジーン構築の改良が必要と考えられた。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

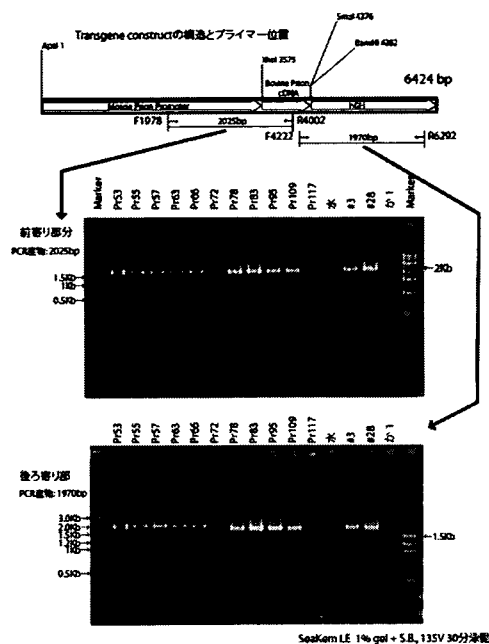
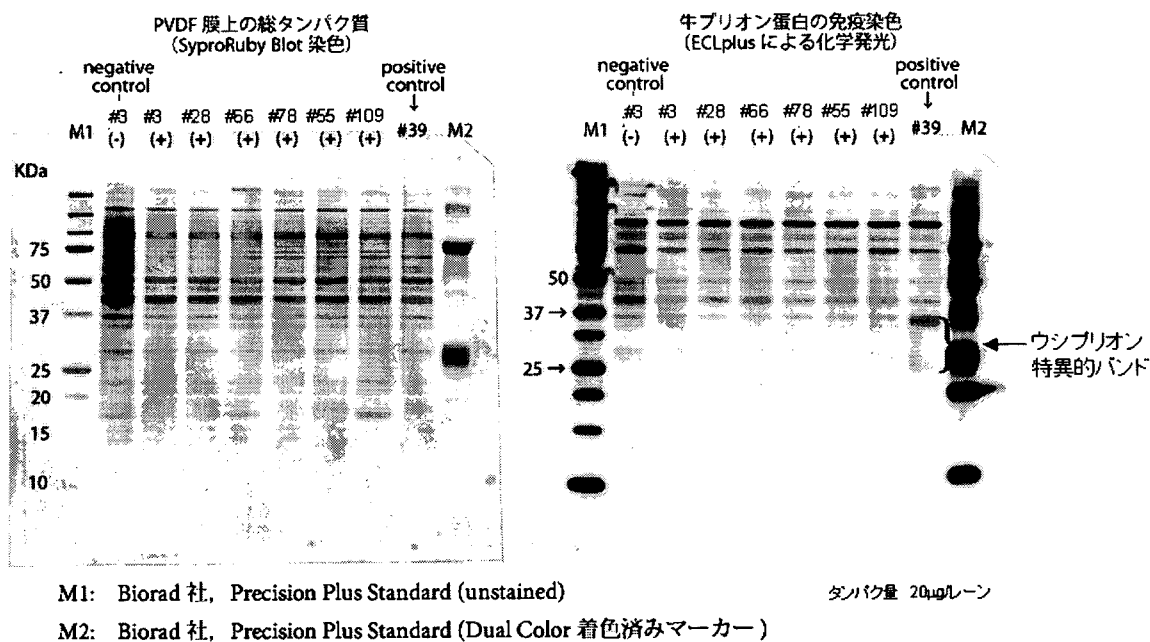


図1. ウシプリオンTgマウスのPCR判定



M1: Biorad 社, Precision Plus Standard (unstained)

タンパク量 20µg/レーン

M2: Biorad 社, Precision Plus Standard (Dual Color 着色済みマーカー)

1次抗体: 抗ウシプリオン・モノクローナル抗体 (WD3C7, Abcam社) 組織: 脳

図2. 新規Tgマウスのウェスタンブロットングによるウシプリオン蛋白発現解析

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 食肉衛生検査所での BSE スクリーニング検査において、複数の試薬メーカーが市販する異常型プリオンたんぱく質(PrP^{Sc})の検出キットが用いられている。これらのキットはいずれもサンドイッチ ELISA 法に基づいた測定システムであり、その検出感度・操作性については、国内外での評価・認証を受けている。しかし、アミロイド凝集体である PrP^{Sc} は、そのままでは抗原部位が十分に露出し難い。それゆえ、PrP^{Sc} を測定対象とするサンドイッチ ELISA 法は、可溶性ホルモンなどを対象としたサンドイッチ ELISA 法とは異なり、抗原-抗体反応の効率を高めるために工夫が必要である。実際、上述の幾つかのキットでは、PrP^{Sc} を尿素などの可溶化剤（変性剤）を用いて緩和に分散させたのちに、抗原-抗体反応を阻害しない可溶化剤濃度まで試料を一旦希釈してから ELISA に供する方法が採られている。現行サンドイッチ ELISA 法のこのような問題点を考慮し、本研究では現行法とは異った原理に基づく PrP^{Sc} の実用的な高感度検出系の開発を目指した。また、本研究で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進めてきたが、前年度までに得られた成果を踏まえ、本年度は CRMP-2 の C 末端欠失が神経細胞の軸索伸長・退縮に及ぼす効果についての神経生化学的な解析を重点的に進めた。更に、非定型 BSE (BSE/JP24 (Sasebo)) の近交系マウスへの伝搬実験については、昨年度からの経過観察を継続した。

【1】選択性に優れた高感度分析法の開発

1-A. 研究目的・背景

わが国の食肉の安全確保のための BSE スクリーニング検査は、ウシ延髄・門部のホモジネート中の PrP^{Sc} の有無を市販のサンドイッチ ELISA キットを用いて判定することにより行われている。しかし、PrP^{Sc} はアミロイド様の高分子凝集体ゆえに難溶性であり、また凝集体であるがゆえに抗原部位が十分に露出し難い。PrP^{Sc} の分散ならびに抗原部位の賦活化を図るため、汎用されている ELISA 法（テセーBSE、BioRad 社；フレライザ BSE、富士レビオ社）では、プロテナーゼ K (PK) 消化によって得た PrP^{Sc} 凝集体を尿素などの可溶化剤（変性剤）に一旦溶解し、その後、添加した可溶化剤が ELISA での抗体と PrP^{Sc} との反応を妨害しないように試料の希釈を行う。即ち現行のサンドイッチ ELISA 法の原理的な問題点として、抗原賦活化の観点からは可溶化剤を用いて PrP^{Sc} 凝集体をできるだけ‘ほぐす’のが望ましいが、一方で、可溶化剤が抗原-抗体反応を妨げてはならない、という相反する条件が求

められている点が挙げられる。このような点を考慮し、現行のサンドイッチ ELISA 法とは異なる新規のアプローチとして、PrP の分子内ジスルフィド結合の還元的切断を含めた十分な変性操作を施すことにより PrP^{Sc} の抗原エピトープを最大限に露出させ、このような還元・変性 PrP を捕捉用抗体を用いずに化学結合を介して固相に固定化し、固相化された PrP を検出するという方法を着想した。本研究は、このような固相化による PrP^{Sc} の高感度スクリーニング検査法の開発とその有用性・実用性について検討を行うことを目的とした。

固相化の具体的方針としては、PK 処理して得た PrP^{Sc} を 6M 塩酸グアニジン中にて 0.1M tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) により還元・変性させ、生じる 2つのシステイン残基のチオール基を maleimide ないし iodoacetyl を有する修飾基を介して固定化することにした。昨年度までにこの基本方針に従って、マウスへ馴化した scrapie 病原体 (Obihiro I 株) を接種した発症マウスの脳ホモジネートを材料として、還元・変性