

PrP をチオール基を介して蛍光性（緑色）マイクロビーズ（固相）上に固定化し、固定化された PrP を蛍光（赤色）標識-抗 PrP 抗体と反応させて、緑/赤 2 色のフロー蛍光検出系 (Agilent 社、2100 Bioanalyzer のマイクロ流路を使用) において検出する、という方法を試みた。その結果、還元・変性 PrP をチオール基を介して固相へ固定化するという点は達成できたが、フロー蛍光検出系での蛍光シグナルの計測は当初に期待したほどの高感度は得られなかった（1つのビーズが1回限りしかフロー検出系を通過しないことが大きな弱点であった。高感度化達成のためには、フロー系にビーズを何回も循環させて、蛍光シグナルを積算計測することが必要と思われた）。更に本法は特殊な測定機器を必要とするため、汎用性に乏しい点を感じた。このような反省から、本年は実用性を重視し、マイクロプレート (ELISA プレート) を固相として検討を行った。

#### 1-B. 研究方法

PrP<sup>Sc</sup> を含む検体は、マウスに馴化した scrapie 病原体 (Obihiro 1 株) を脳内接種した C57BL/6J マウスの全脳ホモジネート (発症終末期に採材)、ならびに BSE/JP5 (Kanagawa) の小脳ホモジネートを用いた。陰性コントロール検体は、上記の発症マウスと同一週齢のプリオン非接種・健常マウスの全脳ホモジネート、および国立感染症研究所に保管されている BSE 陰性ウシの脳ホモジネートを用いた。マイクロプレートは、ELISA プレート A (住友ベークライト、MS-3608F) のアミノ基を通常プロトコールに従って N-succinimidyl(4-iodoacetyl)amino-benzoate (SIAB; PIERCE 社、#22329) により処理したもの、および maleimide 基を有する Sulfhydryl Binding プレート (Corning 社、Cotar 2509) を用いた。PrP の検出用抗体には、6H4 抗体 (Prionics 社)、HRP-標識と抗マウス IgG (KPL 社、074-1806) を用いた。検出は、テセー-BSE (BioRad 社) で使用されている 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 溶液 (本研究では Dako 社、S1599 を使用) による比色反応により行ない、プレートリーダー (BioRad 社、モデル 680) を用いて吸光度を測定した。

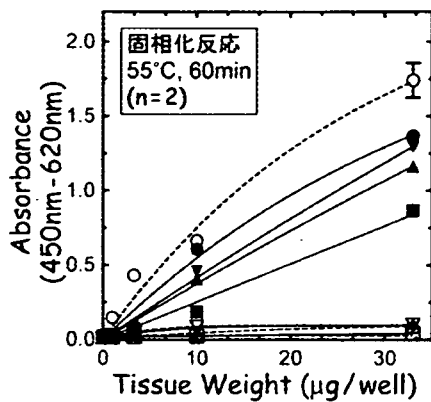
#### 1-C. 研究結果

チオール基を介さない非特異的吸着の有無を

1) Sulfhydryl Binding プレートと 2) SIAB 処理した ELISA プレート A について比較したところ、後者は検出用の抗体を吸着してしまい、そのためバックグラウンド値が高くなってしまふことがわかった。この吸着の原因は、ELISA プレート A の表面に存在する 1 級アミンと 2 級アミンのうち、SIAB と未反応のアミノ基がイオン交換基として機能してしまふためと考えられる。そこで、以後の検討は Sulfhydryl Binding プレートをを用いて行った。

Obihiro 1 株を接種した発症マウスおよび健常コントロールの脳ホモジネートを用い、還元・変性 PrP のプレートへの固相化条件を、pH・温度・固相化反応時間の条件を変えて検討した。その結果、6M 塩酸グアニジン/0.1M TCEP にて還元・変性させた PrP は、pH 6.5、55 °C、60 min の条件でプレートに効率良く固相化できることがわかった。なお、変性剤として SDS を用いると、pH6 以上の条件下では固相化反応の収率が (原因が不明であるが) 著しく低下した (図 1)。変性 PrP のプレートへの固相化後、未反応の maleimide 基はメルカプトエタノール (あるいはジチオスレイトールなどのチオール化合物) によりブロックした。また、検出の選択性を向上させるため、固相化した PrP をリジルエンドペプチダーゼ (Lys-C) で消化し、検出に必要なエピトープ以外をトリミング・除去する操作を加えた。このような種々の条件検討を経て、チャート 1 に示す標準操作法を最終的に設定した。

本法をマウス脳ホモジネートの希釈系列試料に適用したところ、PrP<sup>Sc</sup> の検出限界に当たる発症マウスの脳重量はおよそ 10 $\mu$ g (湿重量) であった。この検出限界は、本法と同一の一次/二次抗体の組み合わせによるウエスタン・ブロット (WB) 分析の検出レベル化学発光検出を使用) にはやや劣るものの、WB にほぼ準じる感度であった (図 2、左パネル)。なお、Sulfhydryl Binding プレートは、購入後 1 年間以上、室温 (16~28°C) にて保管した後でもチオール基との反応収率の著しい低下は認められず、長期保管に支障は無かった。



- 5M Gdn/MES (pH 5.5)      ○ 0.5%SDS/MES (pH 5.5)
- ▲ 5M Gdn/PIPES (pH 6.5)    △ 0.5%SDS//PIPES (pH 6.5)
- ▼ 5M Gdn/HEPES (pH 7.5)   ▽ 0.5%SDS/HEPES (pH 7.5)
- 5M Gdn/Tricine (pH 8.5)   □ 0.5%SDS/Tricine (pH 8.5)

図1 固相化の条件検討 マウスPrP<sup>Sc</sup>を用いて

ところが、本法を BSE 罹患ウシに適用したところ、著しく減弱した ELISA シグナルしか得られなかった(図2、右パネル)。この原因を検討した結果、PK 消化後に得られる PrP<sup>Sc</sup> を含む試料中の夾雑物が PrP のプレートへの固相化を妨害していることが判明した。そこで固相化に先立って、PK 消化物を色素固定アガロースカラム (Reactive Blue4、Reactive Brown10、Reactive Green19、Reactive Red120、Reactive Yellow86、Cibacron Blue 3GA、いずれも Sigma 社) にかけて妨害成分を除去する、あるいは PK 消化物に含まれると予想される遊離チオール基をヨードアセタミドにより予めアルキル化しておく、という前処理を試みたが、残念ながら固相化効率の改善に至っていない。

10% 脳組織ホモジネート in PBS (Obihiro-I 接種マウス脳、BSE/JP5 小脳) を proteinase K により消化 (組織重量の 1/1000 量、37°C、60 min) : <ウシ組織は、始めに collagenase 消化>

BuOH/MeOH (5/1, v/v) 沈殿

0.1M TCEP/6M guanidine-HCl/0.3M PIPES-NaOH (pH6.5) に沈殿を溶解 (← guanidine の代わりに 0.5% SDS も試みる)

Costar Sulphydryl Binding Plate へ (well あたり 40µl をアプライ) : 55°C にて 60~90 min 震盪

40µl の 20mM DTT (または mercaptoethanol) を加え、室温 10 min 静置 (=未反応のマレイミド基を quench)

2M Urea/25mM Tris-HCl (pH8.6) にて洗浄

Lysylendopeptidase in 2M Urea/25mM Tris-HCl (pH8.6) を加え、37°C にて 15 min 消化 (=不要なたんぱく質配列を消化・除去)

PBS-Ti にて洗浄後、一次抗体 (6H4 または 44B1) とインキュベート : 37°C にて 60 min

PBS-Ti にて洗浄後、二次抗体 (HRP-抗マウス IgG/KPL社) とインキュベート : 4°C にて 60 min

PBS-Ti にて洗浄後、100µl の TMB 基質 (DAKO 社) を加えて発色反応 : 75µl の 1M 硫酸により、反応停止後、Abs 450nm と 620nm を測定

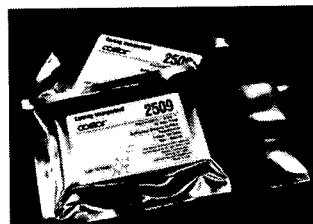


チャート1 固相化法のプロトコール

## 1-D/E. 結論・考察

還元・変性 PrP をチオール基によりマイクロプレートに固定化し、これを高感度検出する方法を開発した。本法では、「チオール基を有する」という必要条件、および「固相化後に Lys-C により不要な配列をトリミング・除去する」という操作によって、検出の選択性の向上を図った。種々の条件検討を経て設定したプロトコールは、脳内に PrP<sup>Sc</sup> を大量に蓄積した実験的発症マウス (終末期) に対して非常に優れた検出感度を発揮した。しかし、食肉衛生検査所で摘発された BSE 罹患ウシ検体 (BSE/JP5) の小脳ホモジネートを測定対象とした場合には、PK 消化後に残存する夾雑成分が還元・変性 PrP の固相化を妨害し、前述のマウスのような高感度検出が不可能であった。これらのフィールドのウシ検体では、実験的発症マウスと比較して組織量当たりの PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量が相対的に低いため、還元・変性 PrP と夾雑物との固相化反応での競合が無視できないためであろう。このような検体に対して本法を実用化するためには、検体の前処理法の開発が必須であると考えられる。

本法は、固相化の際に PrP<sup>Sc</sup> をグアニジン/TCEP を用いて完全に変性させる。プリオンに関するこれまでの知見に照らし合わせると、この操作によりプリオンの感染性は著しく低下すると十分に考えられる。この点において本法は、バイオセーフティーの観点からは優れていると考える。

なお今回は、検出に際して蛍光・発光法を取

えて採用しなかった。その理由は、1) 方法の実用性を重視し、できる限り汎用機器 (吸光度プレートリーダー) の利用を前提とした、2) 吸光度は「吸光度 = log[I<sub>0</sub>/I] (I<sub>0</sub> は光源強度、I は透過光強度)」により規定される絶対値であるのに対して、蛍光・発光は相対値であるために計測値の規格化のために標品の選定が別途必要である、および 3) 検出の酵素基質を対等にする事で既に市販

されている ELISA キット (=吸光度法) との検出感度を比較する、ためである。本法は、マウス試料を用いた結果から推察できるように、夾雑妨害成分の除去が克服できれば、(蛍光・発光法に頼らずとも) 吸光度法を用いて十分な感度が達成できると予想される。無論、上記2) の蛍光・発光シグナルの規格化方法を導入すれば、蛍光・発光を採用することで更なる感度の向上も期待できると考える。

(倫理面への配慮)

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規約を遵守した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## 【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

Obihiro 1 株を脳内接種したマウスの脳の可溶性タンパク質のプロテオーム解析の結果、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積に伴って collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) の C 末端欠失型 (CRMP-2-delC ; 以下 delC) が増加していることを昨年度までの研究で明らかにした。CRMP-2 は神経細胞の軸索伸長・縮退シグナル伝達系の細胞内情報伝達を担い、神経細胞の極性形成に関わる。CRMP-2 のこのような活性は、C 末端部に存在する複数の Ser (S) および Thr (T) 酸基のリン酸化により制御されていることが知られている。しかし、delC

は C 末端部の欠失により、C 末端部のリン酸化に必要なコンセンサス配列の一部を欠失していることが示された。そこで本研究では、delC の C 末端部欠失が神経細胞の軸索伸長・縮退に与える影響について検討した。

### 2-B. 研究方法

全長型 CRMP-2 あるいは delC を発現するプラスミドを pCIneo ベクター (Promega 社) を用いて構築し、GFP 発現プラスミドと共にマウス胎児由来・大脳神経細胞に Neurofect (Genlantis 社) 試薬を用いてトランスフェクトした。トランスフェクション 4 日後に、GFP 蛍光を発する神経細胞について神経突起の長さ、分岐の数を計測した。

### 2-C. 研究結果

初代培養系の大脳皮質神経に全長型 CRMP-2 または delC を発現させたところ、非発現細胞と比較して神経突起の長さは影響を受けなかったが、神経突起の分岐が有意に増えており、その傾向は特に delC 発現細胞において顕著であった。

### 2-D/E. 考察・結論

delC では C 末端部の複数のリン酸化部位の欠失とともに、リン酸化コンセンサス配列が損なわれているために Thr<sup>514</sup> が非リン酸化状態にあると考えられる。Thr<sup>514</sup> のリン酸化は軸索伸長を抑制し、逆に脱リン酸化は促進することが明らかにされている。

delC による突起分岐の亢進は、リン酸化による負の制御がかからないためと考えられた。一方、強制発現した全長型 CRMP-2 では時間の経過とともに細胞内キナーゼにより C 末端がリン酸化され、極性形成活性が抑制されたと推測される。プリオン病の進行過程における delC の発現量の増加が、神経細胞の変性・脱落と如何なる因果関係にあるのかについて

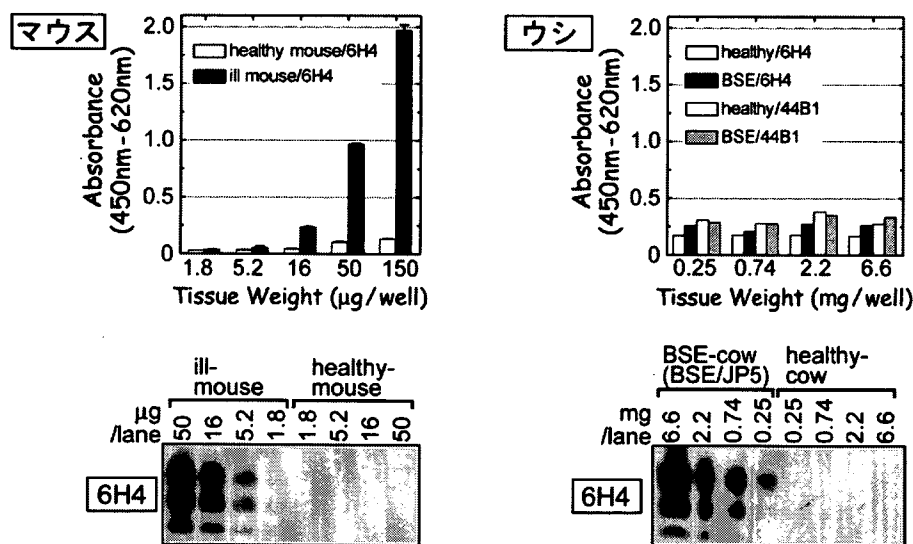


図3 マウス脳ホモジネート (パネル左) とウシ脳ホモジネート (同右) への適用

は、今後の検討課題である。

(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規約を遵守した。

F. 健康危険情報  
特になし。

### 【3】非定型 BSE (BSE/JP24 Sasebo) の近交系マウスへの伝播実験

3-A/B/C. 研究目的・方法・結果

昨年度、定型例 (BSE/JP6 Wakayama、および BSE/JP12 Kumamoto) の対照接種群とともに、非定型例 (BSE/JP24 Sasebo) の脳乳剤を近交系マウス 3 系統: C57BL/6J (6 週齢♀、2006 年 9 月接種)、SJL (6 週齢♀、2006 年 9 月接種) および RIII マウス (4~8 週齢♀、2006 年 10 月接種) へ脳内接種した。現在、経過を継続して観察中である。

(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、感染材料の扱いは国立感染症研究所のバイオセーフティ規約を遵守した。

F. 健康危険情報  
特になし。

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* 30: 835-838, 2007.
- 2) Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y, Nakamura Y, Tobiume M, Shinagawa M, Sata T: Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrP<sup>Sc</sup> in the second atypical bovine encephalopathy case in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60: 305-308, 2007.

2. 学会発表

- 1) 大内史子、山河芳夫、萩原健一: プリオン病発症に伴い増加する CMRP-2 アイソフォームの神経細胞への影響 2007 年プリオン研究会 (津南) 2007. 8.
- 2) 小野文子、寺尾恵治、田勢直美、冷岡明雄、大山篤史、手塚行雄、和田直己、佐藤由子、飛梅実、中村優子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎: 霊長類 (カニクイザル) への BSE の伝播 (I) 脳内接種による発症とそれに伴う行動解析及びプリオンの生体内分布 2007 年プリオン研究会 (津南) 2007. 8.
- 3) 松浦雄一、石川有紀子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎、横山隆、北本哲之、毛利資朗: 迅速バイオアッセイ法による国内非定型 BSE の感染性検出 2007 年プリオン研究会 (津南) 2007. 8.
- 4) 大内史子、山河芳夫、中村優子、花田賢太郎、萩原健一: プリオン病発症に伴う CRMP-2 の量的質的変化の解析 (Proteome analysis reveals quantitative and qualitative changes of CRMP-2 during the progression of prion disease) 第 80 回日本生化学会大会 (横浜) 2007. 12.
- 5) 中村優子、山河芳夫、花田賢太郎、田中恵子、谷田以誠、萩原健一: プリオンタンパク質由来のペプチドによるリソソームにおける異常型プリオンタンパク質の分解促進 (Synthetic fibril peptides promote clearance of scrapie prion protein by lysosomal degradation) 第 80 回日本生化学会大会 (横浜) 2007. 12.
- 6) Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Sato Y, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T: Transmission of BSE to *Cynomolgus* Macaque, a non human primate; Development of clinical symptoms and tissue distribution of PrP<sup>Sc</sup>. "Prion 2007", September, 2007, Edinburgh, UK.
- 7) Hagiwara K: Atypical BSE cases in Japan. "Taiwan and Japan BSE Prevention and Control Conference", October, 2007, Tansui, Taiwan.

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 北海道大学大学院先端生命科学研究院

研究協力者 堀内基広 (北大獣医学研究科プリオン病学)  
藤井文彦 (リサーチレジデント)

研究要旨：半導体量子ドット (Qdot) を用いて、一波長励起の蛍光相互相関分光法 (SL-FCCS) を実現した。SL-FCCS を用いた場合、緩衝液中 (PBS, pH 7.3) で、組換え牛プリオンタンパク質 (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、二波長励起の FCCS (TL-FCCS) と比べて約 10 倍高かった。市販の BSE 検出用 ELISA (プラテリア BSE, Bio-Rad) と比べても約 5 倍高かった。Qdot を用いることによって SL-FCCS が可能となったため、装置の簡素化・低額化が図れ、より検査場に適した装置となった。

略語： SL-FCCS: Single-laser FCCS (一波長励起蛍光相関分光法)

TL-FCCS: Two-laser FCCS (二波長励起蛍光相関分光法)

Qdot: Semiconductor quantum dots (半導体量子ドット)

### 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。

蛍光相互相関分光法 (FCCS) は、2 種類のレーザーと 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を計測する技術である。解析は相互相関関数を用いて行われ、2 種類の信号の時空間的な同時性、つまり 2 種類の分子がどの程度結合しているかを評価することが可能である。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、膨大な試料のスクリーニングに適している。そこで分担者らは、FCCS を用いた現行の一次スクリーニング検査法・ELISA よりも迅速・簡便・高感度な BSE 検査法を提案することを目的とした。

FCCS では通常 2 種類のレーザーを用いるため、光源の正確な重ね合わせが難しく、その結果感度の減弱をまねく。そこで分担者らは、今回新

たなプローブ・半導体量子ドット (Qdot) と有機蛍光色素を利用して一波長励起の FCCS (SL-FCCS) を実現し、二波長励起の FCCS (TL-FCCS) との感度比較を試みた (図 1)。

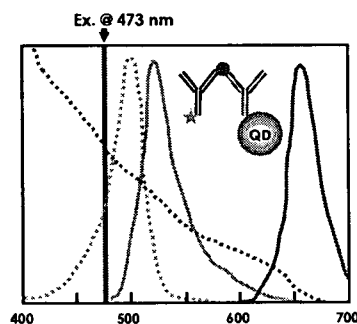


図1: SL-FCCS

### 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。

比較のために、BSE 検出用 ELISA (プラテリア BSE, Bio-Rad) を用いた。

#### 2) 標識抗体の調整

##### (1) TL-FCCS 用の標識抗体：

Alexa Fluor-488 tetrafluoropheny ester (Ex/Em: 495/519) と Alexa Fluor-647 succinimidyl ester (Ex/Em: 650/668) を用いて (ともにインビトロジェン)、抗プリオン抗体 44B1 と 72 にそれぞれ標識を行った。

(2) SL-FCCS 用の標識抗体 :

Alexa Fluor-488 tetrafluoropheny ester (Ex/Em: 495/519) と半導体量子ドット (Qdot) 655 (Em: 655) を用いて (ともにインビトロジェン)、抗プリオン抗体 44B1 と 72 にそれぞれ標識を行った。上記 2 つの標識抗体のペアを用いて、TL-FCCS と SL-FCCS の検出感度を比較した (図 2)。

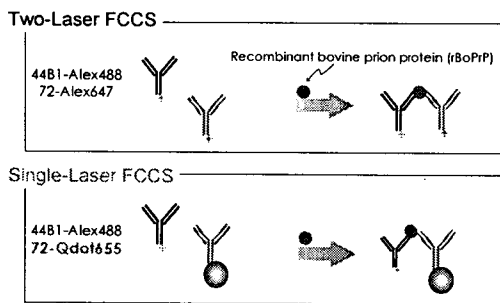


図2: 比較対象

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、主に 2 本の LD 励起固体レーザー (473, 635nm)、1 つの水浸対物レンズ (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)、2 つのピンホール (50  $\mu$ m) から成る。2 種類の蛍光は、570nm のダイクロイックミラーで分離し、495-575nm と 650nm 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。

C. 研究結果

半導体量子ドット (Qdot) を用いて、一波長励起の FCCS (SL-FCCS) を実現することができた (図 3、赤矢印)。

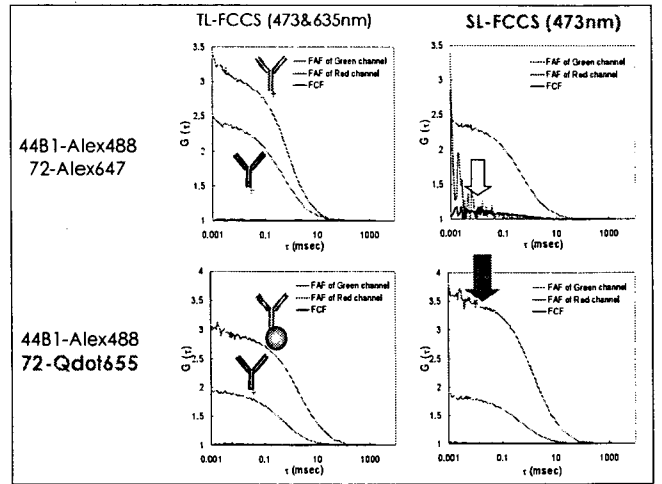


図3: SLとTL-FCCSの比較(励起)

二波長励起の FCCS (TL-FCCS) と同様に、SL-FCCS でも rBoPrP を検出することが可能であった (図 4、赤矢印)。

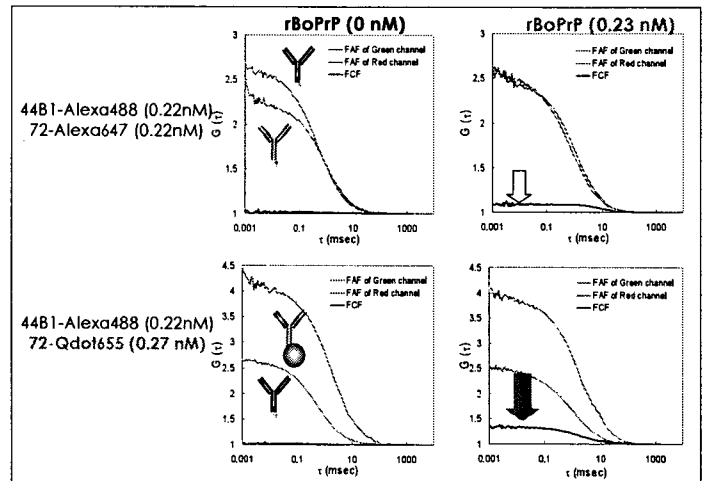


図4: SLとTL-FCCSの比較(検出)

rBoPrP が同濃度の相互相関関数の振幅を比較した場合、SL-FCCS の方が TL-FCCS よりも高かった (図 5、赤破線矢印)。

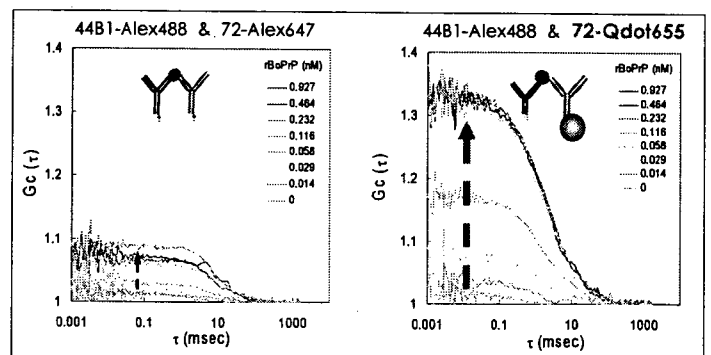


図5: SLとTL-FCCSの比較(関数の振幅)

その結果、SL-FCCSの方がTL-FCCSよりも検出感度が約10倍高くなった(図6、黒矢印)。それぞれの検出限界値は、 $0.029 \pm 0nM$  と  $0.37 \pm 0.49nM$  であった ( $n=3$ )。

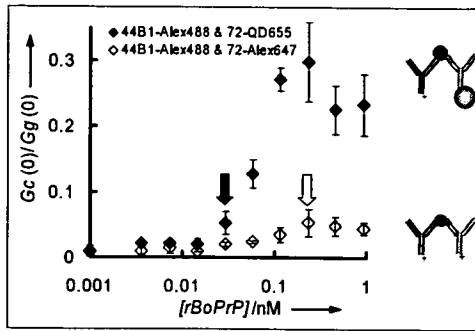


図6: SLとTL-FCCSの比較(検出感度)

#### D. 考察

通常のFCCS測定では、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半導体量子ドット(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の標識に対して1種類のレーザーを用いた一波長励起のFCCS(SL-FCCS)が可能となった。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、信号ノイズ比が高くなることが期待できた。

SL-FCCSとTL-FCCS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(図5)。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、検出感度の向上が達成できた(図6)。

また、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

製造が図れた。

#### E. 結論

一波長励起のFCCS(SL-FCCS)を用いた場合、二波長励起のFCCS(TL-FCCS)を用いた場合よりも10倍検出感度が高かった。この検出感度は、市販のBSE検出用ELISA(プラテリアBSE, Bio-Rad)よりも5倍高かった。一波長励起を実現することにより、簡素化・低額化が図れた。

#### 謝辞

rBoPrPと抗プリオン抗体を提供いただいた富士レビオ帯広研究所の上野雅由、安住純一両氏に感謝いたします。小型FCCS装置を製作いただいた浜松ホトニクス長の長谷川寛、杉江正美両氏に感謝いたします。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

- 1) Fujii F and Kinjo M, Detection of antigen protein using fluorescence cross-correlation spectroscopy and quantum-dots labeled antibody, *ChemBioChem* 8, 2199-2203, 2007.
- 2) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy.. *Anal Biochem*, 370, 131-141, 2007.
- 3) Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y, and Kinjo M. Preparation and characterization of thiacalix[4]arene coated water-soluble CdSe/ZnS quantum dots as a fluorescent probe for Cu<sup>2+</sup> ions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 10(6), 473-479, 2007.
- 4) Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M, Nagai Y Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy.. *J Biol Chem*, 282, 24039-24048, 2007.

#### 1-2. 解説

- 1) 蛍光相関分光法と分子ものさしを用いた細

- 胞内微環境の解析. 金城政孝, 白 燦基. 北海道大学出版会, 73-85(2007)
- 2) 蛍光相関分光法による生体 1 分子解析. 金城政孝. 化学 別冊「分子イメージング」, 72-76(2007)
  - 3) FCS による解析法. 三國新太郎, 金城政孝. 実験医学 別冊「分子間相互相互作用解析ハンドブック」, 85-89 (2007)
  - 4) FCCS によるタンパク質相互作用解析. 三國新太郎, 小暮貴子, 宮脇敦史, 金城政孝. 別冊「分子間相互相互作用解析ハンドブック」, 95-95 (2007)
  - 5) 相互作用の定量化: イメージングと蛍光相関分光法. 金城政孝. 化学と生物 45, 570-756 (2007)

## 2. 学会発表

- 1) 蛍光相関分光法と量子ドットを用いた異常型プリオン蛋白質の検出. 藤井文彦・金城政孝、生物物理学会・北海道支部会、札幌 (2007.3.14)
- 2) Detection of antigen protein using fluorescence cross-correlation spectroscopy and quantum-dots labeled antibody, Fumihiko Fujii, and Masataka Kinjo, International workshop on FCS (2007.11.30)
- 3) Dynamics and interaction of protein in living cell analysis by FCS. Masataka Kinjo. EMBO Practical Course: Imaging in 3D and the F-techniques: FRET, FCS, FLIM and FRAP. Singapore, (18 June 2007)
- 4) 蛍光相関分光法を用いた細胞内微環境の解析. 金城政孝. 第 53 回高分子夏季大学, 北海道 (2007.7.19)
- 5) 次世代バイオイメージングとしての蛍光相関分光法: 分子間相互作用の解析による新たな医学研究の発展. 金城政孝. 産学官連携を指向した最前線セミナー, 東京 (2007.7.27)
- 6) 蛍光相関分光法. 金城政孝. 日本分光学会第 43 回夏期セミナー, 千葉 (2007.8.30)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得出願

- 1) 特許「蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び/又は測定法」 金城政孝, 堀内基広, 藤井文彦, 坂田啓司, 田村守, 上野雅由, 柳谷孝幸. (2006.6.3)

- 2) 特許「膜構造を有する生体構造物の膜機能を解析する方法」 高橋 保夫, 金城 政孝, 田村 守. 特許出願 2004 -50214(P2004-50214) (2006.2.25)
- 3) 「水溶性蛍光材料およびその製造方法」 神隆, 金城 政孝, 田村 守, 藤井 文彦, 坂田 啓司. 特願 2004 -275675 (2006.9.22)



## 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 山本裕介、扇 勉、尾上貞雄、福田茂夫（北海道立畜産試験場）

研究要旨 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、免疫組織化学的染色（IHC）法に代わる異常プリオン蛋白質（PrP<sup>Sc</sup>）の高感度検出法のため、IHC法、ヒストプロット法およびウエスタンブロット（WB）法を組み合わせるPETプロット法の条件を検討した。既報のプロテイナーゼ K（PK）250 $\mu$ g/mlの濃度で55 $^{\circ}$ C一晩反応させて正常プリオン蛋白質を消化する方法に代わって、80 $\mu$ g/mlの濃度で37 $^{\circ}$ Cに設定したブロック恒温器上で途中二回の転倒混和をまじえた30分間処理で、PK処理は十分であった。また、抗原賦活化法を化学的修飾法であるグアニジンチオシアン酸塩処置に代わって、10mMクエン酸緩衝液（pH6.0）で121 $^{\circ}$ C3分間のオートクレーブ熱処理を施したところ、BSEプリオンを接種したウシ型プリオン蛋白質を過発現するTgBoPrPマウスでも非特異的背景染色がない強陽性シグナルが検出できた。さらに、C末端側を認識する抗体を用いることで、BSE牛ならびにBSE接種マウスのPrP<sup>Sc</sup>シグナルを検出できた。脳内のPrP<sup>Sc</sup>検出とマッピングを行う上で、PETプロット法は高感度かつ効率的な手法である。

### 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、免疫組織化学的染色（IHC）法に代わる異常プリオン蛋白質（PrP<sup>Sc</sup>）の高感度検出法のため、IHC法、ヒストプロット法およびウエスタンブロット（WB）法を組み合わせるPETプロット法の条件を検討する。

平成19年度はウシ型プリオン蛋白質を過発現するTgBoPrPマウスに定型BSEの脳乳剤を脳内接種した中枢神経系組織を中心に、改良PETプロット法によるPrP<sup>Sc</sup>検出を検討した。

### B. 研究方法

野外発生例（国内15、17、28、29、30例目）ならびにBSE脳内接種発症牛の脳幹部と脊髄のほか、スクレイピーおよび野外発生BSE脳乳剤を脳内接種したマウスのホルマリン固定ギ酸処理パラフィン包埋材料を用いた。

約3~4 $\mu$ mのパラフィン切片を作製してニトロセルロース膜に塗布後、37 $^{\circ}$ Cの恒温器内で一晩乾燥させた。脱パラフィン後、切片を載せた膜を80 $\mu$ g/mlあるいは100 $\mu$ g/mlのプロテイナーゼ K（PK）をいれたポリエチレン袋に密

封し、37 $^{\circ}$ Cに設定したブロック恒温器上に載せ、30分間処理した。この間、10分おきに反応液の攪拌を二度行った。PK処理後、3Mグアニジンチオシアン酸塩で室温10分間処理（GdnSCN）、蒸留水もしくは10mMクエン酸緩衝液（pH6.0）に浸漬して121 $^{\circ}$ C3分間のオートクレーブ熱処理、あるいは120mM水酸化ナトリウム溶液を用いて室温で10分間の処理をそれぞれ施した。

1.5%スキムミルク溶液で30分間のブロッキング処理後、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（動衛研・田川上席研究員作成）、44B1、43C5（北大・堀内教授作成）、SAF32、SAF54、SAF84（市販）の各抗体を用い、0.03~0.05 $\mu$ g/mlの濃度で室温、1時間30分反応させた。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) PK処理

原法の PK 濃度は 250 $\mu$ g/ml、55 $^{\circ}$ Cで一晩の消化を行うが、この方法で IHC の結果と比較すると感度が低下するとともに、染色むらが生じた。このことから、PK 処理をブロック恒温器上で 37 $^{\circ}$ C15 分、55 $^{\circ}$ C15 分行う二段階法を実施したところ、染色むらが減じた（昨年報告）。この方法でも染色むらを完全に除去できなかったことから、37 $^{\circ}$ Cのブロック恒温器上で 30 分間処理する間に二度の PK 反応液の転倒混和を施したところ、二段階法に比較して残存組織が完全に消化されるとともに、染色むらや非特異的背景染色がほとんどあられることがなくなった。

## 2) 抗原賦活化

原法では PK 処理後、3M もしくは 4M の GdnSCN で室温 10 分間処理する。マウススクレイピーでは、この GdnSCN 前処理法に限らず、オートクレーブ法や水酸化ナトリウム法でも常に良好な結果が得られた（図 1）が、BSE 牛ならびに BSE 接種マウスでの陽性シグナルは弱く、さらにウシ型プリオン蛋白質を過発現する TgBoPrP マウスの対照脳組織でも非特異的背景染色が残存した（図 2）。そこで、GdnSCN に代わって蒸留水あるいは 10mM クエン酸緩衝液（pH6.0）に浸漬して 121 $^{\circ}$ C3 分間のオートクレーブ熱処理を施したところ、非特異的背景染色が減じた陽性シグナルが検出された。なお、陽性シグナルの強度は、蒸留水よりもクエン酸緩衝液の方が強かった。

TgBoPrP マウスに BSE 脳乳剤を脳内接種したところ、主に延髄迷走神経背側核、前頭葉臭球腔周囲、視床手綱核（図 3）に、またこの BSE 発症 TgBoPrP マウスを 3 代継代した TgBoPrP マウスでは脳梁に密発するアミロイド斑に一致して強陽性シグナルが検出された。

## 3) 抗体

昨年に引き続き種々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された。

## 4) 改良 PET プロット法を用いた末梢組織からの PK 抵抗性 PrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>res</sup>) の検出

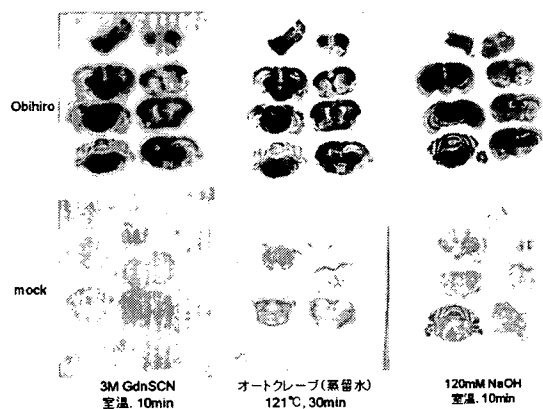


図1. スクレイピー帯広株脳内接種ICRマウスでの抗原賦活化法による比較

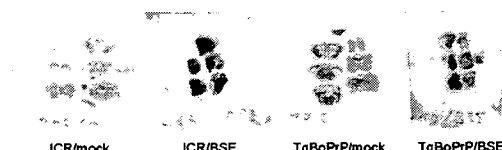


図2. BSE脳内接種マウスでの比較

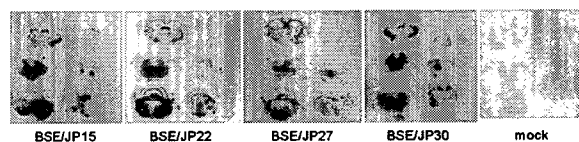


図3. 野外発生BSE脳内接種TgBoPrPマウスでの比較

WB 法で感染脳の 100 分の 1 から 1,000 分の 1 の量が検出される BSE 牛症例の副腎、末梢神経を用いて改良 PET プロット法を施したが、検索した材料から陽性シグナルは検出されなかった。

## D. 考察

ホルムアルデヒド（ホルマリン）は 8 つのアミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、スレオニン、セリン）と反応し、蛋白質を安定化するとされている。PET ではアルデヒド固定の架橋反応により抗原基がマスクされ、抗体が抗原に到達できないことから"染色されない"、あるいは"免疫反応が弱い"結果となることが知られている。この架橋反応を緩く解きほぐす、あるいは変性・分解により抗原基を露出させることが抗原賦活化であると説明されているが、正確なメカニズムは明らかにされていない。しかし、特定の項目についてはこれらの賦活化効果は明らかであり、指定の賦活化を前処理として確実にを行うことが基本となる。

IHC では、PrP<sup>Sc</sup> 検出のための抗原賦活化と適切な抗体の選択が重要となる。IHC での抗原賦活化はギ酸や GdnSCN による化学的修飾、PK などの蛋白分解酵素を用いた酵素処理およびオートクレーブを用いた加熱処理、あるいはこれらを組み合わせた方法が必要となる。PET ブロット法では、主に PK 処理により正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) の消化とともに残存する組織の消化を施し、PrP<sup>res</sup> を高感度ならびに効率的に検出する手法である。原法では 250µg/ml の濃度で 55°C 一晚 (16 時間) かけて PrP<sup>C</sup> を消化している。しかし、実際に恒温器あるいは恒温槽を 55°C に設定しても、反応液はこの温度には到達することはない。昨年、BSE 脳では原法よりも PK 濃度を低く抑えたとともに、正確な反応温度に近づけるべくブロック恒温器上で 37°C と 55°C の二段階で消化効率を上げ、かつ短時間で PrP<sup>C</sup> を消化することで、IHC とほぼ同じ程度のシグナル検出が可能となった。しかし、ウシ型プリオン蛋白質過発現マウスである TgBoPrP マウスでは非特異的背景染色が残存した。そこで、PK 処理中に溶液を数度混和して、残存組織と PrP<sup>C</sup> を確実に消化したところ、非特異的背景染色が低減し、結果として陽性シグナルの増強につながった。これらのことから、PK 処理では確実な残存組織と PrP<sup>C</sup> の消化が重要であり、通常 WB 法で用いられている PK の濃度と時間で十分であることが判明した。

PrP<sup>Sc</sup> 検出のための IHC 法では、スライドガラスに塗布した PET 切片を各種抗原賦活化溶液に浸漬してオートクレーブ熱処理するのが一般的である。抗原賦活化溶液として、蒸留水、クエン酸緩衝液、希塩酸溶液などが用いられているが、最近ではクエン酸緩衝液を用いた報告が多い。そこで、BSE 材料を用いて蒸留水とクエン酸緩衝液による PET ブロット法での抗原賦活化を検討したところ、IHC 法と同じくクエン酸緩衝液を用いた方がより陽性シグナルの増強効果が得られた。また TgBoPrP マウスでみられる非特異的背景染色も減少した。

これらのことから、まず第一に PK 処理では確実な残存組織と PrP<sup>C</sup> の消化が重要であり、通常 WB 法で用いられる PK の濃度と時間で十分である、第二に IHC 同様にクエン酸緩衝液を用いた 121°C 3 分間のオートクレーブ熱処理

が PET ブロット法でも有効である、そして第三に使用する抗体は C 末端側を認識する抗体が適しており、場合によってはその他の抗体と組み合わせたカクテル抗体を用いることで、PET ブロット法では高感度かつ効率的に PrP<sup>res</sup> を検出できることが明らかとなった。

しかしながら、このように改良した PET ブロット法を用いても、WB 法で PrP<sup>res</sup> が検出される BSE 牛症例の副腎、末梢神経などから陽性シグナルは検出されなかった。その要因として、WB 法では 200mg の生組織材料を用いても感染脳の 100 分の 1 から 1,000 分の 1 の PrP<sup>res</sup> 量と極めて少なく、わずか 3~4µm 厚のパラフィン切片ではその PrP<sup>res</sup> 量がさらに極少であることから、PET ブロット法で BSE 牛の副腎や末梢神経などの末梢組織から PrP<sup>res</sup> を検出することは困難であると推察された。

一方、感度の観点から PET ブロット法を IHC 法と比較すると、一次抗体を 10~100 倍に、二次抗体を 250~1,000 倍にそれぞれ希釈しても PrP<sup>res</sup> の検出ができ、また検出するまでの時間は IHC 法とほぼ同じくらいであることから、PET ブロット法は高感度かつ効率的な PrP<sup>res</sup> 検出法といえる。

## E. 結論

IHC 法、ヒストブロット法および WB 法を組み合わせる PET ブロット法は、組織中での PrP<sup>res</sup> の局在と量を検索する上で、極めて有効な手法である。

## 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<sup>Sc</sup>)を検出するには従来法の検出限界をはるかに凌ぐ超高感度な技法の開発が必要である。本研究では PrP<sup>Sc</sup> を試験管内で増幅する PMCA 法の原理に基づき、全自動反応装置を用いて PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率、再現性、処理検体数等について改良し、プリオン病、特に BSE の診断技術を開発することを目的とする。本年度は、PrP<sup>C</sup> の非特異的凝集体(PrP<sup>C-res</sup>)形成を抑制できるジギトニン法および Phase shift 法をスクレイピー感染リスザル由来 PrP<sup>Sc</sup> および BSE 感染カニクイザル由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅に応用した。いずれの増幅法でも各 PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率はハムスターやマウスと比較して低く、高感度検出には至らなかった。

### A. 研究目的

異常プリオンタンパク質(PrP<sup>Sc</sup>)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<sup>Sc</sup> の増幅には極めて有効である。PMCA 産物を希釈し、増幅を繰り返すことにより PrP<sup>Sc</sup> の超高感度検出が可能であり、感染ハムスターの血液・尿を用いた生前診断の可能性について解析し、報告した。一方、ハムスター以外の動物種由来の PrP<sup>Sc</sup> の高効率増幅はこれまで困難であったが、昨年度マウス PrP<sup>Sc</sup> の増幅に適した増幅法(ジギトニン法)を開発し、高感度検出を可能にした。植物サポニンを用いる増幅法は CWD 由来 PrP<sup>Sc</sup> でも有効であることがその後、報告されている。本年度は、スクレイピー感染リスザル由来の PrP<sup>Sc</sup> および BSE 感染カニクイザル由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅をジギトニン法により行い、その有効性を検討した。加えて、マウス PrP<sup>Sc</sup> の高感度検出が可能な新規の増幅法(Phase shift 法)をカニクイザル PrP<sup>Sc</sup> の増幅に応用し、同様に検討した。

### B. 研究方法

#### 1) PMCA

0.5% TritonX100-4 mM EDTA-0.05% Digitonin -PBS を用いてリスザル、カニクイザル正常 10%脳乳剤を作成し遠心後、その上

清を PrP<sup>C</sup> ソースとして用いた。Phase shift 法では、ジギトニンを添加しない緩衝液で PrP<sup>C</sup> ソースを作製した。霊長類由来 PrP<sup>Sc</sup> シードは、霊長類センターで感染実験に供されたリスザル(3例、海馬あるいは小脳)およびカニクイザル(1例、頭頂葉)の脳サンプルから 10%脳乳剤を調整した。各 PrP<sup>Sc</sup> シードは、 $10^{-2}$ ~ $10^{-5}$  になるよう PrP<sup>C</sup> ソースと混合・希釈し、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 40 サイクルの増幅反応を行った。

#### 2) PrP<sup>res</sup> の検出

PMCA 産物を PK 消化後、HRP 標識 T2 抗体あるいは AP 標識 3F4 抗体を用いてウェスタンブロットを行い、PrP<sup>res</sup> を検出した。

### C. 研究結果

#### 1) リスザル PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 増幅結果

増幅前にわずかにシグナルが確認できるようなスクレイピー感染リスザル脳乳剤を 100 倍希釈し、増幅を行った結果を図 1 左に示す。反応後、No seed コントロールでの PrP<sup>C-res</sup> 形成が著しく、高いバックグラウンドのため、いずれのリスザルにおいても PrP<sup>res</sup> 増幅は確認できなかった。図 1 右にジギトニンを緩衝液に添加して増幅を行った結果を示す。シードに用いた PrP<sup>Sc</sup> がほとんど確認できない状態、すなわち 1/1000 量のシードを用いて増幅した。

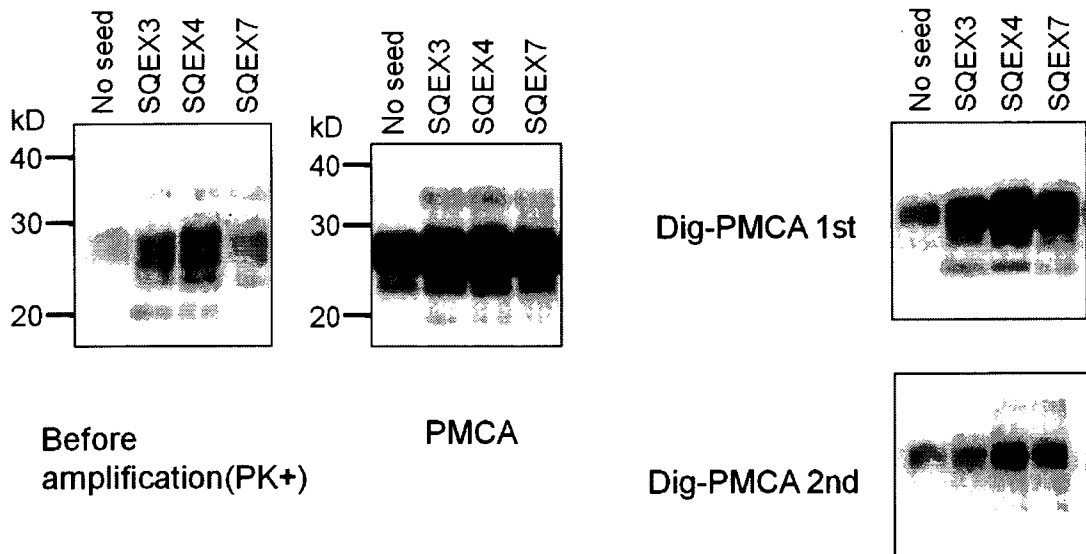


図1 スクレイピー感染リスザル由来 PrP<sup>Sc</sup>の増幅結果. PMCA: 通常増幅、Dig-PMCA: ジギトニン法による増幅.

ジギトニン添加により、PrP<sup>C-res</sup> 形成は完全ではないが有意に抑制され、リスザル PrP<sup>Sc</sup>が増幅されていることを確認した。PMCA 産物を 1/10 に希釈し、2回目の増幅を行ったところ、シグナル強度の増強は認められず、むしろ減衰傾向を示した。したがって、ジギトニン法はリスザル由来スクレイピーPrP<sup>Sc</sup> の高感度検出には有効ではなかった。

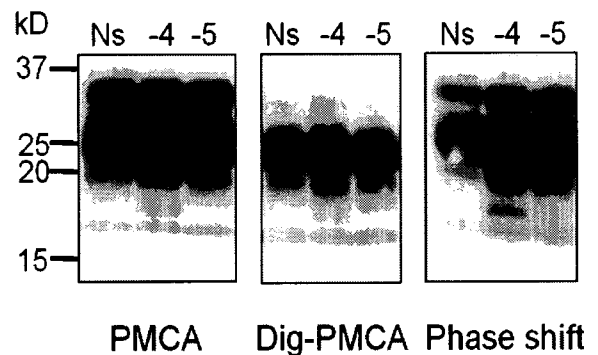


図2 BSE 感染カニクイザル由来 PrP<sup>Sc</sup>の増幅結果.

## 2) カニクイザル PrP<sup>Sc</sup>のPMCA増幅結果

BSE 感染カニクイザル脳乳剤を  $10^{-4} \sim 10^{-5}$  に希釈し、通常の PMCA 法、ジギトニン法および Phase shift 法を用いて増幅した結果を図 2 に示す。リスザルに比べて、カニクイザルでは PrP<sup>C-res</sup> 形成の傾向がより高く (Ns, No seed コントロール)、いずれの方法でも PrP<sup>res</sup> の増幅はほとんど確認できなかった。

## D. 考察

PrP<sup>C-res</sup> 形成は、マウス、牛だけでなく、霊長類でも観察された。マウス PrP<sup>Sc</sup> はジギトニン法により効率的に増幅でき、PMCA 産物を希釈・増幅を繰り返す Sequential PMCA により高感度検出が可能である。牛でもジギトニン法により PrP<sup>C-res</sup> 形成を抑制することはできたが、Sequential PMCA を行っても検出感度はほとんど改善されないことを昨年度報告した。霊長類では PrP<sup>C-res</sup> 形成が著しく高く、ジギトニン法でも PrP<sup>C-res</sup> を完全には抑制できず、リ

スザルでは若干の増幅が認められるものの、高感度検出には至らなかった。

PrP<sup>C-res</sup> が形成されると、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換が阻害されると考えられる。高効率な増幅には、非特異的な PrP<sup>C-res</sup> 形成と PrP<sup>res</sup> 増幅反応を分離する必要がある。新たに開発した Phase shift 法はジギトニン法と同様、マウス PrP<sup>Sc</sup> の増幅に有効であり、検出感度はジギトニン法より優れている。しかしながら、Phase shift 法をカニクイザル PrP<sup>Sc</sup> の増幅に応用しても BSE PrP<sup>Sc</sup> と同様、効果は認められなかった。

Sequential PMCA 法による検出限界は、ハム

スタースクレイピー株、Sc237の場合、10%感染脳乳剤の $10^{-12}$ 希釈溶液に含まれるPrP<sup>Sc</sup>量に相当する。PrP<sup>Sc</sup>の検出法としては現在、最も感度が高い。今回解析した霊長類の感染脳乳剤には十分量のPrP<sup>Sc</sup>が含まれていた。したがって、BSEや霊長類モデルの生前診断にPMCA法を応用するためには、3~4回のSequential PMCAで $10^{-8}$ ~ $10^{-9}$ に希釈したサンプルからPrP<sup>Sc</sup>を検出できなければならない。原理的には、どの動物種由来のPrP<sup>Sc</sup>もPMCA法により増幅できると考えられるが、至適増幅条件が各PrP<sup>Sc</sup>で異なっている可能性が本研究により明らかになった。今後、各PrP<sup>Sc</sup>の指数関数的増幅が行える条件の確立が必要である。

#### E. 結論

スクレイピー感染リスザル、BSE感染カンクイザル由来の脳乳剤をシードに用いて、ジギトニン法、Phase shift法で増幅を検討したが効率が低く、高感度検出には至らなかった。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshioka M, Murayama Y, Miwa T, Miura K, Takata M, Yokoyama T, Nishizawa K, Mohri S: Assessment of prion inactivation by combined use of *Bacillus*-derived protease and SDS. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71:2565-2568.
- 2) Murayama Y, Yoshioka M, Okada H, Takata M, Yokoyama T, Mohri S: Urinary excretion and blood level of prions in scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* 2007, 88:2890-2898.
- 3) Yokoyama T, Masujin K, Yamakawa Y, Sata T, Murayama Y, Shu Y, Okada H, Mohri S, Shinagawa M: Experimental transmission of two young and one suspended bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases to bovinized transgenic mice. *Jpn J Infect Dis* 2007, 60: 317-320.
- 4) Suyama K, Yoshioka M, Akagawa M, Murayama Y, Horii H, Takata M, Yokoyama T,

Mohri S: Assessment of prion inactivation by Fenton reaction using protein misfolding cyclic amplification and bioassay. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71:2069-2071.

- 5) Suyama K, Yoshioka M, Akagawa M, Murayama Y, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Mohri S: Prion inactivation by the Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 356:245-248.

##### 2. 学会発表

- 1) 吉岡 都、村山裕一、横山 隆、毛利資郎：PMCAによって生成されたPrP<sup>res</sup>の性状解析。2007年プリオン研究会（津南）2007.8.
- 2) 須山享三、吉岡 都、村山裕一、高田益宏、横山 隆、毛利資郎：遷移金属として鉄イオンを用いたフェントン反応による異常プリオン蛋白質の不活性化—バイオアッセイとPMCA法による評価—。2007年プリオン研究会（津南）2007.8.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

## 7. 牛海綿状脳症(BSE)プリオンの生物学的性状と「種の壁」のメカニズム解明

分担研究者 横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者 舛甚賢太郎、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 (BSE/JP8)、若齢型 BSE (BSE/JP9) の伝達試験を行ったが、両症例の TgBoPrP への伝達性は認められなかった。しかし、接種した TgBoPrP には PK 消化後に約 25kDa の抗 PrP 抗体と反応するシグナルが検出された。このバンドの伝達性の有無を確認するために2代目の継代を行ったが、伝達性は認められなかった。過剰発現マウスでは、加齢に伴ってプロテイナーゼ K 抵抗性 PrP<sup>C</sup> が出現することが示された。このバンドは BSE 由来の PrP<sup>Sc</sup> と分子量、糖鎖型が異なっていた。

### 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/JP8 (非定型), BSE/JP9 (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<sup>Sc</sup>)の有無を検討するとともに、TgBoPrP マウスおよび野生型マウス(ICR)への伝達試験を行った。さらに BSE/JP24 について伝達試験を開始した。

2) BSE 脳乳剤、野生型マウス初代および2代継代 BSE プリオンをマウスおよびハムスターのキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウス(MHM2, MH2M)に接種し潜伏期の差異およびマウス脳内に蓄積する PrP<sup>Sc</sup> の性状について解析する。また、TgBoPrP で継代した BSE プリオンについても同様の解析を行い、「種の壁」のメカニズム解明を試みる。

### C. 研究結果

1) TgBoPrP を用いた BSE/JP8, BSE/JP9 の伝達試験では、初代では脳内接種後最長 900 日まで観察を行ったが、マウスに異常は認められなかった。ウエスタンブロットでマウスの脳内の PrP<sup>Sc</sup> の検出を試みたところ、約 25kDa の PK 抵抗性のシグナルが検出された。このバンドの伝達性の有無を確認するために、初代マウス(未発症)の脳試料を TgBoPrP および ICR マウスへ脳内接種し、2代目の観察を行ったが、最長 847 日の観察で異常を認めなかった(表)。TgBoPrP マウスの加齢に伴う

変化について検討したところ、約 25kDa のバンドは若齢マウスでは認められず、500 日齢以上の老齢マウスで出現することが示された。IHC では PrP<sup>Sc</sup> のシグナルは検出されなかった。

BSE/JP24 (非定型) の伝達試験は、継続実施中である。BSE/JP24 を接種したノックインマウスの脾臓から PrP<sup>Sc</sup> が検出され、その伝達性が確認されている。

Transmission study of Japanese BSE cases			
Inoculum	mice	No. diseased/	
		no. inoculated	mean ± SE (days) or sacrificed days
<b>BSE/JP8<sup>1</sup></b>			
Primary passage	TgBoPrP	0/5	(600, 786, 788, 788, 860)
2nd passage	TgBoPrP	0/6	(623, 623, 791, 799, 839, 847)
2nd passage	ICR	0/6	(589, 700, 701, 714, 768, 853)
<b>BSE/JP9<sup>2</sup></b>			
Primary passage	TgBoPrP	0/6	(505, 577, 704, 881, 927, 927)
2nd passage	TgBoPrP	0/7	(714, 719, 731, 748, 748, 748, 748)
2nd passage	ICR	0/5	(407, 484, 545, 659, 659)
Suspended-1 <sup>3</sup>	TgBoPrP	0/7	(717, 811, 831, 864, 864, 892, 927)
PBS	TgBoPrP	0/5	(432, 475, 534, 609, 717)
BSE/JP6 <sup>4</sup>	TgBoPrP	5/5	277.2 ± 12.2

All mice were tested for the presence of PrP<sup>Sc</sup> in the brain by WB, and mice that were positive were considered to be diseased

<sup>1</sup> case of atypical BSE in a 23-month-old Holstein steer

<sup>2</sup> case of classical BSE in a 21-month-old Holstein steer

<sup>3</sup> BSE diagnosis was suspended in a 20-year-old Japanese Black. The faint unusual PrP<sup>Sc</sup>-like band was observed by WB; however, no spongiform change or PrP<sup>Sc</sup> deposition were detected in pathology

<sup>4</sup> case of classical BSE in a 83-month-old Holstein cow

2) マウスおよびハムスターのキメラ PrP を発現する MH2M, MHM2 に BSE/JP24 を接種し、定型 BSE との宿主域の違いの有無について検討中である。

#### D. 考察

BSE/JP8, BSE/JP9 材料を接種した牛型 PrP 発現マウス(TgBoPrP) に発症は認められなかった。接種マウスの脳内には 25kDa の PrP 断片と考えられるシグナルが検出されたことから、このマウスの脳乳剤を TgBoPrP および ICR マウスへ継代した。これらマウスへの伝達性および PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は認められなかったことから、BSE/JP8, BSE/JP9 の TgBoPrP への伝達試験は陰性と判断した。

#### 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<sup>2.7</sup> ID<sub>50</sub>/g であることが示された。BSE/JP24 の伝達性は、示されたがその生物学的性状の検討は今後の課題である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Masujin K, Shimada K, Kimura KM, Imamura M, Yoshida A, Iwamaru Y, Mohri S, Yokoyama T. Applicability of current bovine spongiform encephalopathy (BSE) diagnostic procedures for chronic wasting disease (CWD). *Microbiol. Immunol.* 2007, 51: 1039-1043.
- 2) Yokoyama T, Masujin K, Yamakawa Y, Sata T, Murayama Y, Shu Y, Okada H, Mohri S, Shinagawa M. Experimental transmission of two young and one suspended bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases to bovinized transgenic mice. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2007, 60: 317-320.
- 3) Masujin K, Matthews D, Wells GA, Mohri S, Yokoyama T. Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. *J. Gen. Virol.* 2007, 88: 1850-1858.
- 4) 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<sup>Sc</sup>. *Arch. Virol.* 2007, 152: 603-609.

##### 2. 学会発表

- 1) Yokoyama T, Masujin K, Shu Y, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S. Characterization of an abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the bovine spongiform encephalopathy (BSE) resistant animals. *Prion* 2007, 2007.9. Edinburgh.
- 2) Masujin K., Wells GAH, Matthews D, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Shimizu Y, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Prions in peripheral nervous system tissues in bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Prion* 2007, 2007.9. Edinburgh.
- 3) An SSA, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Fabre G, Segarra C, Ju YR, Schmerr MJ, Yokoyama T, Kim SY, Andreoletti O, Coste J. Detection of PrP<sup>Sc</sup> in plasma from scrapie sheep in preclinical stage using a Multimer Detection System-3D. *Prion* 2007, 2007.9. Edinburgh.
- 4) Yokoyama T.. Current status of transmissible spongiform encephalopathy in Japan. *International symposium on animal and human*



prion diseases (BSE, CWD and scrapie).  
2007.10.16. Seoul.

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および中枢神経系の比較病態について—

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・感染病理)

**研究要旨** Scrapie(Y5)を対照に BSE(KUS)の各種実験動物への伝達を試みた。マウス、スナネズミ、モルモットに加え、これまで経過観察中だったハムスター、ラットについても一定の成績が得られたので、中枢神経系の病態と併せ報告する。Scrapie プリオンについてはマウス、スナネズミ、アルメニアンハムスターおよびラットに伝達可能であった。これに対して BSE プリオンは、マウス、スナネズミ、アルメニアンハムスターおよびモルモットに伝達可能であった。これら、伝達可能であった動物はアルメニアンハムスターを除き、接種した動物の糖鎖型に類似した糖鎖型を示した。BSE プリオン接種初代マウス、スナネズミでは小脳への蓄積がほとんどみられず、BSE の病態は反映していなかった。一方、BSE 接種モルモットではグリアタイプのパターンと小脳の蓄積を含め BSE に類似した病態を示した。また、モルモット二代目では小脳分子層に強い蓄積がみられ、プルキンエ細胞の脱落や樹状突起の腫大といった動物プリオン病ではきわめて稀な病態を示し、sCJD に類似した病態を示した。ラット、モルモットの大型げっ歯類での病態の検討は BSE を含むプリオン病の解明には有用な動物種であると結論された。

### 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、羊やブタをはじめとする各種産業動物やねこ科動物への伝達性については報告があるものの、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。

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、Scrapie 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。また、BSE の病態のみならず、プリオンの蓄積が動物種によっては特異な病態を表現する可能性もあり、そのような動物種を新たに見出すことも目的としている。前

年度までに感染動物の一部については脾臓、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。本年度では継続して観察していた動物への伝達性についても、中枢神経系における病態を比較検討したので報告する。

### 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)、シリアンハムスター (Syrian、SLC、♀、3 週齢)、アルメニアンハムスター (Armenian、Cytogen (USA)、♂、5 週齢)、およびラット (Wistar、クレア、♀、3 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、かつ終末期に至るか、あるいは神経症状

を有さないが、衰弱するまで観察を行い、解剖を行った。これら発症動物の一部については脳組織より脳乳剤を作製し、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。

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(135DWA 法)の前処理後、抗プリオン抗体として B103、110 抗体を用いて免疫組織化学的染色(IHC 法)を実施した。脳乳剤のウェスタンブロット (WB) 解析については 132 抗体を用い、定法に従って行った。

#### (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表 1 にまとめた。IHC 法および WB 法のどちらか一方で陽性を示したものを陽性とした。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、アルメニアンハムスターおよびラットで伝達が可能であったが、シリアンハムスターおよびモルモットには伝達できなかった。BSE プリオンについてはマウス、スナネズミ、アルメニアンハムスターおよびモルモットに伝達可能であったが、シリアンハムスターおよびラットでは伝達性を確認できなかった。シリアンハムスターでは臨床症状を伴わない突然死および 1 例では肝臓腫瘍により死亡がみられた。伝達可能であったアルメニアンハムスターでは Fighting による致命的けがと突然死およびラットでは下垂体腫瘍や脳膿瘍によると思われる臨床症状と乳腺腫瘍により安楽殺を実施している。

これら動物の中樞神経系の WB 法による解析では、BSE 接種アルメニアンハムスター以外いずれも免疫組織化学的結果と一致した。IHC 法で小脳脚に巣状陽性を示した BSE 接種アルメニアンハムスターは WB 法では陰性を示した。WB 法による泳動パターンでは接種動物に類似する糖鎖パターンを示したが、Scrapie 接種アルメニアンハムスターについては BSE に類似する糖鎖型を示した (図 1)。

伝達可能であった動物はいずれも IHC 法で蓄

積が確認された部位では海綿状態あるいは組織の粗鬆化がみられ、アストログリアの増加が観察された。ICR マウスでは Scrapie 接種ではアミロイド斑の形成を伴うものの、BSE 接種とは蓄積分布の点では大きな違いはみられなかった。しかしながら、BSE 接種マウスでは小脳の皮質や神経核への親和性は軽度だった (図 2)。スナネズミでは手綱核を含む視床脳内側の分布は BSE 接種と Scrapie 接種では反転した蓄積分布を示した。小脳病変についてはマウスと同様の傾向を示した (図 3)。BSE 接種アルメニアンハムスターでは前述したように、小脳脚に巣状の陽性像が得られた以外陽性所見は得られなかった。Scrapie 接種アルメニアンハムスターでは顆粒状の陽性所見が、大脳皮質、視床や脳幹部網様体に認められた (図 4)。Scrapie 接種ラットでは瀰漫性あるいは斑状の陽性所見が大脳皮質や視床を中心に観察された。また、小脳および脳幹部では歯状核や前庭神経核等に特異的に蓄積がみられた (図 4)。BSE 接種モルモットでは視床や小脳および脳幹部を中心に瀰漫性からグリアタイプに分類される放射状の蓄積様式を示した。モルモット二代目では蓄積様式はほぼ同様を示すものの、小脳分子層における蓄積が顕著となり、プルキンエ細胞の脱落や樹状突起の顕著な腫大が観察された (図 5)。

### D. 考察

今回、Scrapie(Y5)を対照として、BSE(KUS)の各種実験動物への伝達性を調べた。その結果、マウスに加え、スナネズミ、アルメニアンハムスターおよびモルモットに伝達可能であることがわかった。アルメニアンハムスターについては WB 法では陽性が得られなかったものの、B103、110 抗体により IHC 法にて同様結果が得られたことから陽性と判断した。BSE 接種アルメニアンハムスターでは Fighting 等により蓄積量が十分となる前に死亡したことが、WB 陽性が得られなかったものと思われた。シリアンハムスターとアルメニアンハムスターについてはプリオン蛋白のアミノ酸についていくつかの違いがあることが報告されている。今回シリアンハムスターへは BSE、Scrapie とともに伝達ができなかったが、アルメニアンハムスターでは両者の伝達が可能であった。アミノ酸の相同性が単純に伝達性に関与していることに異論はあるが、ハムスター間のアミノ酸の違いが今回の伝達性にひとつの要因として関与しているものと思われ、種の壁等に関する研究に

は有用な動物種と考えられた。WB 法では非糖鎖型、糖鎖型部位での分子量には違いがみられるものの、Scrapie 接種アルメニアンハムスターを除いてはいずれも接種した動物の糖鎖型に類似した成績が得られた。Scrapie 接種アルメニアンハムスターでは BSE に類似した糖鎖型を示した。糖鎖型の特徴は BSE と vCJD の関連を意義付ける診断的価値を有し、また、今回の実験と同様に BSE 接種動物では一般に BSE の糖鎖型に類似したパターンを示すことが知られている。実験手技上の取り違いについては問題ないことを確認しているが、今回のような報告はこれまでになく、再接種を含め、継代、生化学的解析等の更なる検証を行う予定である。

病理学的にはマウス、スナネズミでは Scrapie 接種動物では比較的小脳顆粒層や分子層への蓄積が強いのにに対して、BSE 接種動物では小脳への蓄積はほとんどみられない。BSE や Scrapie では伝達経路から脳幹部神経核を中心に蓄積がみられ、臨床症状を示したものでは小脳皮質部位も病変好発部位の一つとなっている。感染ルートの検討とともに、神経核を同定し詳細な神経解剖学的な検討は必要と思われるが、脾臓での蓄積、病変の分布や潜伏期を含め、BSE の病態を解析するモデルとしては不十分かもしれない。一方、Scrapie 接種ラットでは神経核あるいは神経細胞体周囲に比較的特異的な蓄積がみられた。BSE や Scrapie の侵入門戸については一定の見解が得られているものの、プリオンの脳内での広がり方については神経解剖学的観点からの説明は難しいのが現状である。ラットのような特徴的な分布を示す動物種の検討はプリオンの脳内での広がりを検討する上では有用な動物種であるかもしれない。モルモットでは初代動物で比較的短期間の潜伏期を示したことから二代目まで観察が可能であった。初代、二代目ともにグリア型の沈着様式が優勢であり、小脳での蓄積も他の動物種に比べ強く見られた。特に、二代目では小脳分子層の蓄積が顕著で、プルキンエ細胞の脱落や樹状突起の腫大といった変性変化が観察された。BSE や Scrapie ではプリオンの蓄積が強い場合においてもこのような変性変化は伴わず、動物プリオン病ではきわめて稀な変化がみだされた。このような変化は sCJD にみられる変化に類似していることを指摘されたが（東北大・堂浦教授）、生化学的なタイピングを含め詳細な病理学的検討は BSE のみならずプリオン病の病態を知る上で重要と考

えられた。

Tg や Knock-in を含むマウスは免疫系を含め様々な assay 系が確立されているため種々の解析には有用な動物モデルではあるが、病態モデルや神経病理学的解析には今回の検索で示したようなラット、モルモットといった大型げっ歯類での検討も合わせて実施していくことで病態の違いや発症機構解明にさらなる成果が得られることが期待される。

## E. 結 論

BSE および Scrapie について各種実験動物への伝達試験を行った。その結果、マウス、スナネズミ、アルメニアンハムスターおよびモルモットに伝達可能であった。大型げっ歯類であるモルモットや Scrapie の伝達が可能であったラットでは特異的な病態がみられ、これら動物モデルの生化学的な性状と病変分布を含む病態の解析により、BSE プリオンを含むプリオンの生物学的性状やプリオンタイプと病態の関連について成果が得られるものと考えられる。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ohara J, Togari T, Kurokawa A, Maeda J, Ishiguro N, Furuoka H and Horiuchi M: Frequencies of PrP genotypes in meat breeds of Japanese sheep and trail of selective breeding in experimental sheep flock. *J. Vet. Med. Sci.* 69(12): 1325-1329. (2007)

### 2. 学会発表

1) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M and Sata T: Species-specificity of a panel of prion protein antibodies for the immunohistochemical study of animal and human prion diseases. *NeuroPrion* 2007, September 2007, Edinburgh, UK.

## 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