

Fig. 1

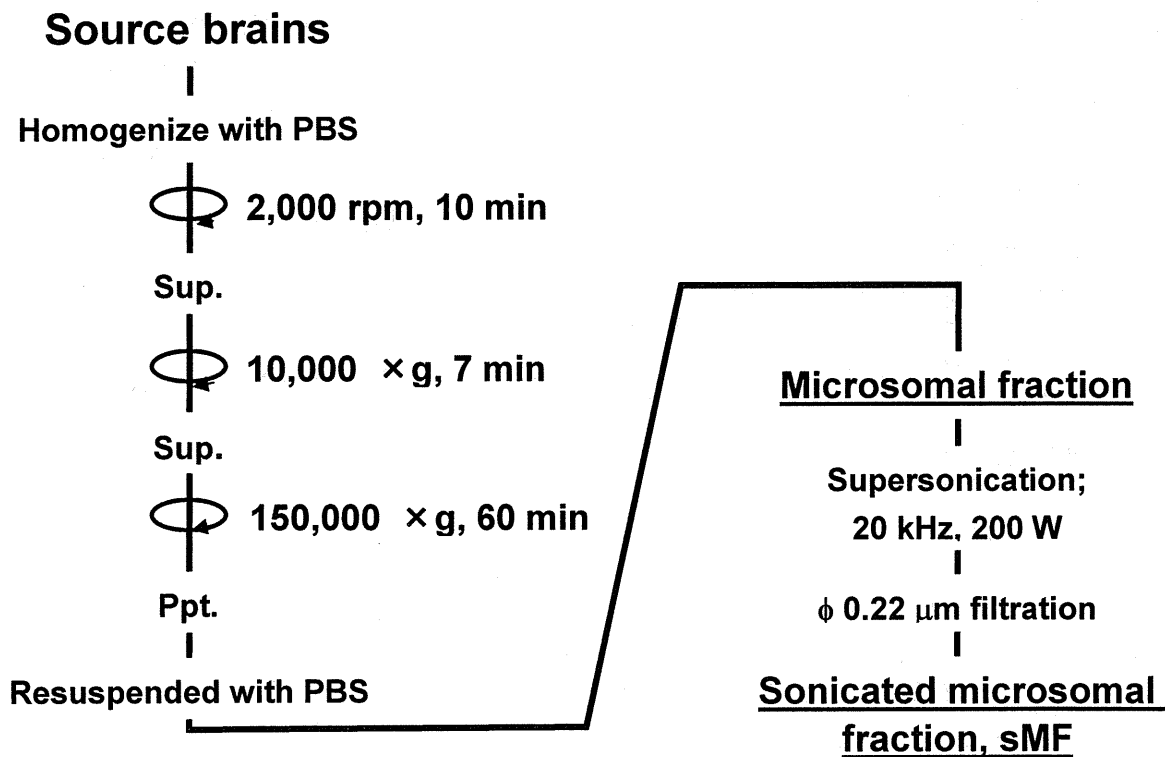
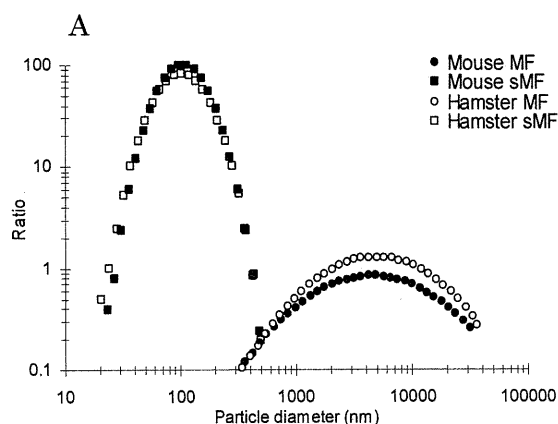


Fig. 1 マウス馴化 vCJD 感染マウス脳あるいはハムスター馴化 Scrapie263K 感染ハムスター脳からの Microsomal fraction と Sonicated microsomal fraction, sMF の調整方法

Fig. 2



B

平均粒子径		
Microsomal fraction (non-sonicated)	Mouse	11820 nm
	Hamster	8626 nm
Sonicated microsomal fraction	Mouse	126.7 nm
	Hamster	125.5 nm

Fig.2 マウス馴化 vCJD 株およびハムスター-263K 株から調整した Microsomal fraction (●, ○) と Sonicated microsomal fraction, sMF (■, □) の粒度分布図 (A) と平均粒子径 (B)

Table 1 各種ろ過膜による PBS 中の vCJD 除去 (WB 法による評価)

プリオン株	プリオン材料	Planova 15N (孔径 約 15nm)	Mustang E (孔径 約 200nm)	Zetaplus 90LA (孔径 約 0.1~0.5 μ m)
vCJD	sMF ¹⁾	2.8	≥ 3.5	2.8
Scrapie 263K	sMF ¹⁾	≥ 3.2	Effective ²⁾	≥ 2.4

除去能は Log Reduction Factor として示した。

1) : 感染動物脳由来 MF を超音波処理したもの。

2) : 定性評価の為数値は示していない

Fig. 3

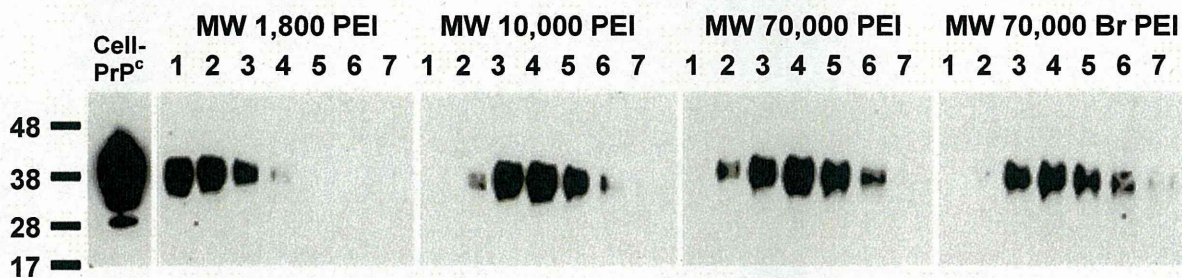


Fig. 3

4種のPEIビーズのPrP吸着能の比較

分子量及び構造が異なる4種類のPEIビーズ、MW 1800、MW 10000、MW 70000、MW 70000 Br に、培養細胞由来の組成精したPrP^Cを負荷した。レーンの内訳は以下の通りである。Cell-PrP^C; 負荷したPrP^C、1; Flow through、2; 200 mM NaCl 溶出画分、3; 400 mM NaCl 溶出画分、4; 600 mM NaCl 溶出画分、5; 800 mM NaCl 溶出画分、6; 1 M NaCl 溶出画分、7; PEI ビーズ sample buffer 処理画分。

Table 2 マウス馴化 vCJD sMF を用いたプリオン除去効果

Condition	Antithrombin	Albumin	PBS
Filter	Planova15N	Planova15N	MW 70000 Br
Log Reduction Factor	≥ 3.5	≥ 3.1	Effective

Fig. 4

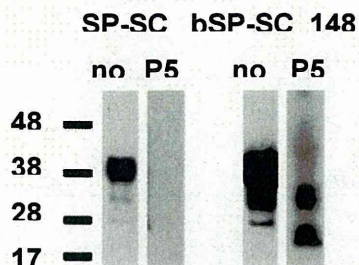


Fig. 4 クローン間の PrPC 発現量と mo-vCJD への感染効率
クローン化する前の SP-SC と単クローン化した bSP-SC_148 について、(no)は mo-vCJD 感染前に PK 未処理で、(P5)は mo-vCJD に細胞を感染させてから 5 回経代したものを PK 処理して、それぞれ WB 法により PrPC と PrPres を検出した。1 レーンあたりの細胞数は(no)、(P5)でそれぞれ 3×10^3 、 1.5×10^5 個となっている。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
（総合研究報告書）

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法及び
プリオン除去工程評価に関する研究（H22（H23）-医薬-一般-006）

分担研究者 酪農学園大学獣医学群 教授 萩原 克郎
研究協力者 株式会社ベネシス 柚木 幹弘、坂井 薫、久保 純

研究要旨：

マウス馴化 vCJD 株（mo-vCJD）感染モデル動物の確立を目的として、生後 1 日齢と 30 日齢マウスにそれぞれ mo-vCJD 株を接種し臨床所見を比較した。

- ④ 感染マウス脳乳剤 1%及び 5%を FVB/n マウスに接種したところ、1 日齢マウスよりも 30 日齢マウスで体重減少及び神経症状を伴う瀕死状態（Terminal ill、以下 TI）の発現が早期であった（体重減少：90（1%接種）、90（5%接種）dpi TI：158（1%接種）、153（5%接種）dpi）。
- ⑤ TI 時点での異常型プリオン蛋白（PrP^{res}）の脳内蓄積量は、大脳、中脳及び延髄に多く、接種日齢による PrP^{res} 蓄積部位とその量に差は見られなかった。
- ⑥ 病理学的所見をスコア化し比較したところ、延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であったが、接種日齢による差は認められなかった。
- ⑦ 30 日齢マウスでは接種後 90 日目には脳への PrP^{res} の蓄積が定性的に観察され、120 日目前後には複数の異常行動に加え、脳での定量的な PrP^{res} の蓄積と病理スコアの増加がともに観察された。

以上の知見から、発症までの期間が生後 1 日齢マウスよりも 30 日齢マウスで早かったこと及び行動異常と脳での PrP^{res} の蓄積ならびに病理変化が全て 120 日目前後までに観察されたことから、mo-vCJD を用いた感染評価では 30 日齢マウスでの接種が適していることが明らかとなった。

A. 研究目的

バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去能力評価は、安全な医薬品製造において重要な課題である。本研究では、マウス馴化 vCJD（mo-vCJD）株を用いた in vivo 評価手法を確立するために mo-vCJD 感染マウス脳乳剤をマウスに接種する発症モデルを検討した。

B. 研究方法

vCJD 感染モデルの作出は、マウスに馴化させた mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤（1%及び 5%）を用い、生後 1 日齢及び 30 日齢の FVB/n マウスに上記乳剤を脳内接種し、臨床

所見（異常行動などの有無）を観察した。発症した個体は瀕死状態（Terminal ill、以下 TI）に至った時点で剖検して脳を採取した。発症しなかった個体は予定飼育期間終了まで観察した後に剖検し脳を採取した。採取した右脳は大脳、中脳、小脳、延髄に分け、それぞれの部位における Proteinase K 抵抗性プリオン蛋白（PrP^{res}）の蓄積をウェスタンブロット（WB）法で測定した。左脳については、組織解析用にホルマリン固定し、定法に従い組織切片を作成し、免疫染色（PrP^{res}）、GFAP、HE 染色を行った。GFAP 及び HE 染色におけるグリアの増生、空砲変性及び神経変性について病理学的評

価を実施し、それぞれ0から3迄の4段階でスコア化した。これらの結果を用いて、接種日齢差による発症期間の比較を検討した。

倫理面への配慮。プリオン感染サンプルは酪農学園大学病原体等安全管理委員会の規定(共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定)に従い取り扱った。動物実験は酪農学園大学動物実験指針の規定(共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定)に従い実施した。

C. 研究成果

①一次抗体として6D11を利用したWB法条件を決定した。シグナル強度を指標としてマウス脳由来PrP^{res}定量評価手法を確立した。

②mo-vCJD感染後のマウスを観察したところ、1日齢マウスへの接種では、対照個体に対して体重増加率が低く、約180dpiまで緩やかに増加した(Fig. 1右図)。その後、発症しTI状態に至るまで急激な体重減少が見られた。なおTIに至るまでの平均日数は1%、5% mo-vCJD接種群でそれぞれ191、196日であった(Table 1)。30日齢マウスではリアリング(後肢のみでの起立)頻度の低下や歩行異常などの異常行動などの所見が約100日前後に一項目以上観察され(Table 1)、120日目には2項目以上観察された(後述④)。TIにいたるまでの期間は30日齢マウスの方が1日齢マウスに比べて30~40日短く1%、5% mo-vCJD接種群でそれぞれ158、153日であった(Table 1)。

③1日齢マウスに接種し、発症したマウスのTIにおいては小脳に比べ、延髄、大脳、中脳でPrP^{res}の蓄積が多く見られた(Fig. 2右図)。病理学的所見のスコアでは延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であった(Fig. 3右図)。30日齢マウスに接種した場合のTIも同様に小脳に比べ、延髄、大脳、中脳

でPrP^{res}の蓄積が多く見られた(Fig. 2左図)。病理学的所見のスコアでも延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であった(Fig. 3左図)この2種類の接種条件を比較すると、脳部位毎のPrP^{res}の蓄積量は両者とも類似しており、脳部位毎の病理学的所見スコアの傾向も両接種群間で同様であったが、スコアの平均値は1日齢接種マウスが高かった(Fig. 3)。

④30日齢マウスではリアリング(後肢のみでの起立)頻度の低下や歩行異常などが前述のように約100日前後に観察され始め(Table 1)、120日前後には全ての接種動物で2項目以上の異常行動が観察された(Fig. 4)。脳内PrP^{res}は臨床所見が認められる時期よりも早い約90日目よりWBにより定性的に検出され(data not shown)、118日目には定量的に観察された。脳内PrP^{res}はTIにいたる数日で急激に蓄積する傾向が観察された(Fig. 5)。また、病理変化も異常行動が観察される118日目から摂取量に依存して観察され、1%接種群では151日目にかけて病理スコアの経時的な増加が見られた。TI直前の151日目には延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であった(Fig. 6)。

D. 考察

vCJD感染マウスモデルを検討するには、発症までの期間と再現性、病変の特徴等を評価しやすいものであることが望ましい。一般的にプリオン感染症は、発症までの期間が長く実験条件が難しい面を有していた。ヒトのvCJD発症例では、平均26歳で発症し、その潜伏期間は約10年と考えられている。本研究では、発症までの期間がマウスの接種日齢に影響するか否かを検討した。

その結果、1日齢マウスにmo-vCJDを接種

した方が潜伏期間は長期化傾向を示した。末期の個体間では脳内の PrP^{res} の蓄積量に有意な差はないが、病理学的所見のスコアは1日齢マウスの方が大きくなったことから、脳の発達段階における vCJD 感染は、脳の変性に影響を及ぼすことが推察された。

E. 結論

バイオ医薬品の製造工程において PrP 除去効果を評価する動物試験では、実験手技の簡便性、実験期間、組織病変所見等を考慮すると30日齢マウスへの接種が感染マウスモデルとして適当であると考えられる。

F. 健康危険情報

特筆する情報なし

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する発表)

1. 論文発表

○Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals* 2010 38(2):311-313.

Yunoki M, Kubota-Koketsu R, Urayama T, Sasaki T, Analiwa D, Konoshima Y, Ideno S, Fukunaga Y, Morikawa S, Hiroi S, Takahashi K, Okuno Y, Hagiwara K, Ikuta K. Significant neutralizing activity of human immunoglobulin preparations against pandemic 2009 H1N1. *British Journal of Haematology*. 2010; 148(6):953-955.

Urayama T, Sapsutthipas S, Tsujikawa M, Yamashita A, Nishigaki H, Ibrahim MS, Hagiwara K, Yunoki M, Yasunaga T, Yamaguchi T and Ikuta K. Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in

Fecal Samples from Domestic Swine in Japan. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010; 72(4), 11-19

Kato-Mori Y, Orihashi T, Kanai Y, Sato M, Sera K, Hagiwara K. Fermentation Metabolites from *Lactobacillus gasseri* and *Propionibacterium freudenreichii* Exert Bacteriocidal Effects in Mice. *J Med Food*. 2010 ;13(6):1460-1467

Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res*. 2010; 77: 1-4 (Published online: 07 Dec 2010).

Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. *BMC Res Notes*. 2012 Jan 5;5(1):4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22217009.

Hagiwara K, Ando T, Koiwa M. The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. *J Vet Med Sci*. 2011 Nov 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22123302.

Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res*. 2011 Feb;78(1):118-21. Epub 2010 Dec 7. PubMed PMID: 21134313.

Hisaeda K, Arima H, Sonobe T, Nasu M, Hagiwara K, Kirisawa R, Takahashi T, Kikuchi N, Nagahata H. Changes in Acute-Phase Proteins and Cytokines in Serum and Milk Whey from Dairy Cows with Naturally Occurring Peracute Mastitis Caused by *Klebsiella pneumoniae* and the Relationship to Clinical Outcome. *J Vet Med Sci*. 2011 Dec;73(11):1399-404. Epub 2011 Jun 28. PubMed PMID: 21712644.

◎柚木 幹弘、萩原 克郎、生田 和良. バイオ医薬品におけるプリオンの問題ーヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題ー. *人工血液* 2011; 18(4): 142-150.

2. 学会発表

◎久保 純、大久保 祐士、中川 典子、佐々木 祐

子、柚木 幹弘、Larisa Cervenakova、萩原 克郎、
生田 和良。vCJD を用いた血漿分画製剤の工程
評価 (O1-4-15)。第 58 回日本ウイルス学会学
術集会 2010 年 (徳島)。

©Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal
by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE
Safety Forum. June 2011, Barcelona, Spain.

◎久保 純、大久保 裕士、中川 典子、坂井 薫、
柚木 幹弘、川見 祥代、萩原 克郎、生田 和良。
バイオ医薬品からのマウス馴化型 vCJD の除去
の可能性; 作用機序が異なる 3 種類のろ過膜の
プリオン除去能。第 35 回日本血液事業学会
2011 年 10 月 20-22 日、埼玉。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得：なし

実用新案登録：なし

I. その他：

本研究の一部は株式会社ベネシスとの共同
研究として実施した。

研究協力者：(株)ベネシス 柚木 幹弘、坂井 薫、
久保 純

Fig. 1

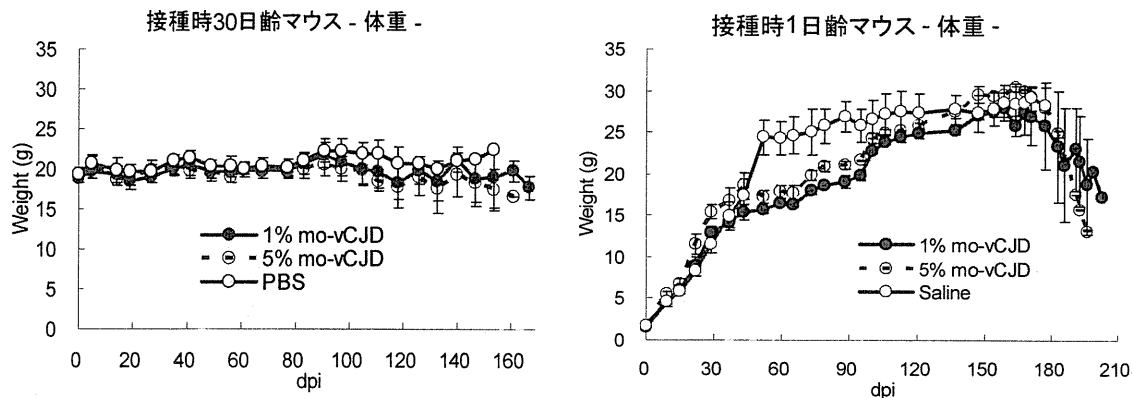


Fig.1 mo-vCJD 接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスの体重の推移

Table 1. mo-vCJD 接種から主要な病態発症までの期間 (dpi: days post-infection)

接種材料	接種時30日齢マウス		接種時1日齢マウス	
	1% mo-vCJD	5% mo-vCJD	1% mo-vCJD	5% mo-vCJD
Terminal illに至るまでの期間	158 dpi	153 dpi	191 dpi	196 dpi
体重減少開始	90 dpi	90 dpi	159 dpi	164 dpi
異常行動開始*	約100 dpi	約100 dpi	188 dpi	191 dpi

*接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスでは評価項目が異なる

Fig. 2

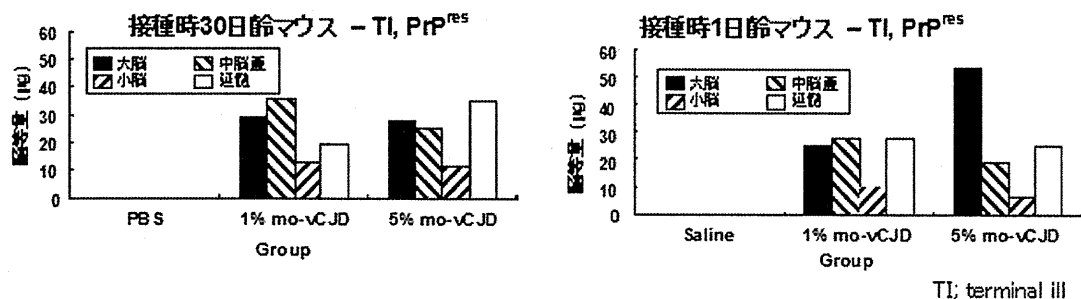


Fig. 2 接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスの脳内における PrP^{res} の量
採取した脳は、大脳、中脳、小脳、延髄に分け、WB 法により PrP^{res} 量を測定した。Y 軸は測定した 1.6% 脳乳剤の、接種に用いた瀕死状態の接種時 30 日齢マウスに対する脳等量として示した。

Fig. 3

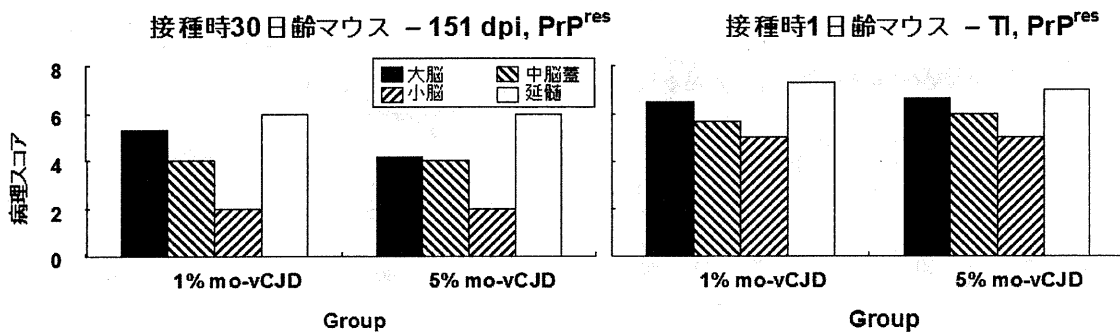


Fig. 3 接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスの脳の病理学的所見
採取した脳について GFAP , HE 染色を施し, 大脳, 中脳, 小脳, 延髄についてそれぞれスコア化した。

Fig. 4

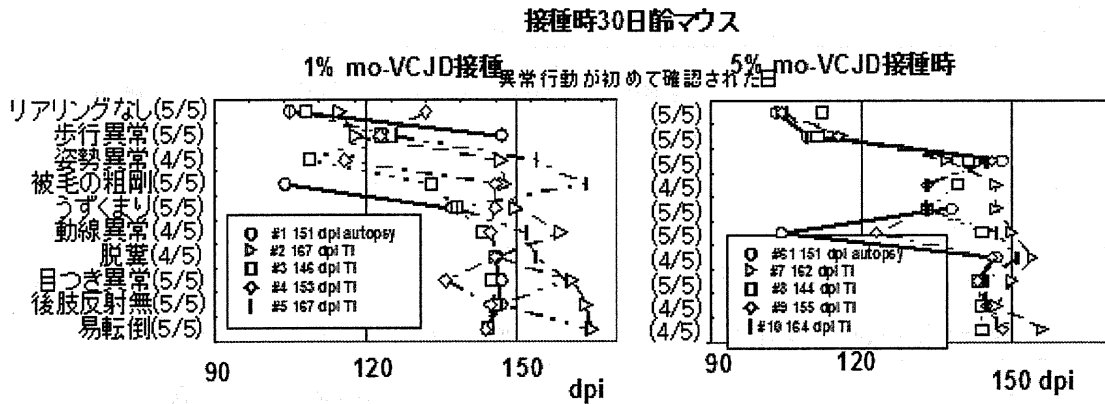


Fig. 4 mo-vCJD 接種時 30 日齢マウスの主な異常行動確認の経時変化

Fig. 5

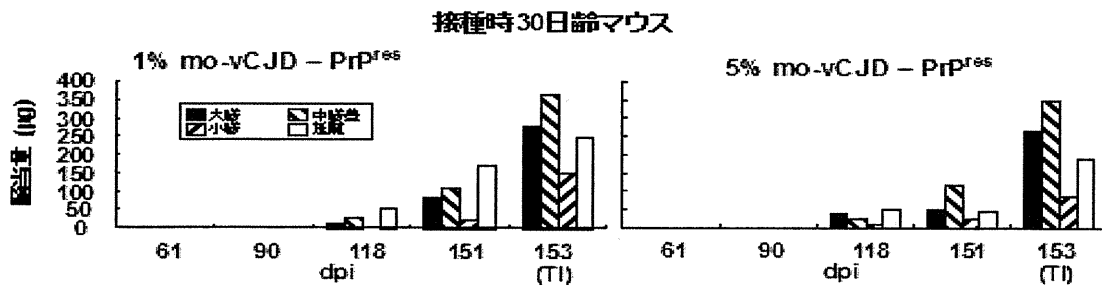


Fig. 5 mo-vCJD 接種時 30 日齢マウスの脳部位別の PrP^{res} 蓄積量の経時変化 (定量)

Fig.6

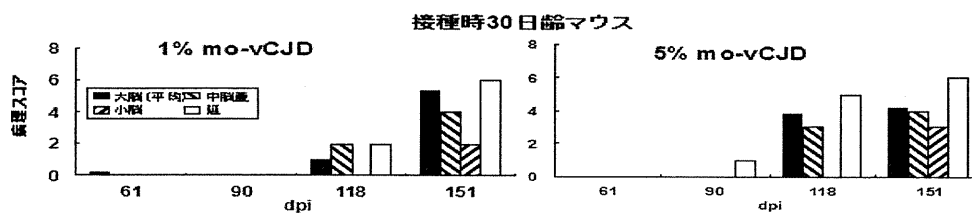


Fig.6 mo-vCJD 接種時 30 日齢マウスの脳の病理学的所見
採取した脳について GFAP, HE 染色を施し, 大脳, 中脳, 小脳, 延髄についてそれぞれスコア化した.

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合
研究事業）

平成22・23年度分担総合研究報告書

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出法及び

プリオン除去工程評価に関する研究

・異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究・

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入する恐れがあるウシ異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の高感度な検出法の開発が望まれている。動物由来製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とし、特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体の作製を行った。

PrP^{Sc}形成の初期段階に、ヒトPrPのN端側43残基のセリン(S43)がリン酸化S43 (pS43)に変化することから、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を基にリン酸化プリオンペプチド抗原[pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP及びpS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP]を合成し、マウスを免疫して特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体を調製した。

マウス21匹を4回免疫し、抗体価が上昇したマウス脾細胞を用いて細胞融合を行った。免疫原に芳香環を含むMBSを架橋剤として用いたpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIPでは、特異抗体を産生するハイブリドーマは樹立出来なかった。一方、免疫原に直鎖状のSPDPを架橋剤として用いたpS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIPでは、特異抗体を産生するハイブリドーマ3株を樹立した。その培養上清はイムノブロット法で抗プリオン蛋白質抗体6H4と同様な挙動を示してPrP^{Sc}を認識し、単量体及び二量体のPrPに相当するバンドを示した。

これらの研究成果はPrP^{Sc}やBSE罹患ヒツジ試料を用いた解析等への応用が期待され、今後はPrP^{Sc}のマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染初期でのPrP^{Sc}検出法確立等への利用を試みる。

A. 研究目的

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性CJD、プリオン(PrP)遺伝子(PRNP)にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝型CJD及びPRNPに変異のない散发型CJDが知られ、約85-90%を散发性CJDが占めている。一方、1996年に英国で発症が確認された変異型CJDは、従来の散发型CJDとは異なって若年性の患者で発症し、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシPrP^{Sc}が人へ伝達して発症すると考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例が報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。多くの遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いることから、医薬品へのPrP^{Sc}汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP^{Sc}測定法の確立が望まれている。

本研究は PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体を作製し、新たな検出法の開発を目的とする。スクレイピー(Obihiro 株)を ICR マウスの脳内に投与して増幅された PrP^{Sc} を抗原とし、マウスを免疫し、正常型ではなく PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体の作製を行う。

最近、PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリン(S43)をリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告された(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* 29, 8743–8751)。PrP^{Sc}が形成される初期にリン酸化S43 (pS43)への変換が予測され、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、プリオン病の早期診断への利用が期待される。

本研究ではPrP^{Sc}感染マウス脳の作製を行うとともに、pS43-PrPを特異的に認識する抗体の調製を試みた。

B. 研究方法

1. 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体の作製

ヒトPrPのアミノ酸配列39-50残基を抗原とし、その43残基のSerがリン酸化されたリン酸化プリオンペプチド[pS43-hPrP (39-50)-Cys]及び通常のプリオンペプチド[hPrP (39-50)-Cys]を合成した。架橋剤として芳香環を含むMBS又は直鎖状のSPDPを用い、水溶性キャリア蛋白質Blue Carrier Immunogenic Protein (BCIP)に結合させた免疫原pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP (Fig. 1A)又はpS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP (Fig. 1B)を調製した。マウス(BALB/c)を数回免疫後、脾臓から調製した脾細胞とマウス・ミエローマ細胞PAIの細胞融合を行った。培養上清のスクリーニングは、架橋剤のMBSでウシ血清アルブミン(BSA)とペプチドを結合させたpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA又はhPrP (39-50)-Cys-MBS-BSAを固相抗原として用いたELISAで行った。

2. スクレイピー感染脳乳液の調製

スクレイピー(obihiro株)感染マウス凍結脳は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 プリオン病研究センター 横山隆 チーム長から御供与いただいた。マウスへのPrP^{Sc}感染実験は、広島大学広島大学大学院 生物圏科学研究科 免疫生物学研究室 松田治男教授に御教授いただいた。

ICRマウスの脳にスクレイピー(obihiro株)10%脳乳液を投与し、4か月後に安楽死させた。得られたスクレイピー感染脳を左右に二分割し、それぞれを0.32 Mショ糖溶液を用いて10%脳乳液を調製し、以降の実験に用いた。

3. イムノブロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)または抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノブロッティングを行い、化学発光法で検出した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に報告されたヒトPrPの43残基近傍のアミノ酸配列はほ乳類で高度に保存されており、本研究ではリン酸化セリンを含むヒトPrP (39-50)ペプチドを用いてマウスを免疫した。抗体価の測定はELISAで行い、固相抗原のリン酸化セリンを含まないhPrP (39-50)ペプチドを認識せず、リン酸化セリンを含むpS43-hPrP (39-50)を特異的に認識するマウスをスクリーニングした。21匹のマウスを4回免疫し、リン酸化セリンを特異的に認識するマウスを得た。最も抗体価が上昇した1匹のマウスを最終免疫し、3日後に安楽死させたマウスから全採血して抗血清を調製、併せて摘出した脾臓を用いてマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を行った。

架橋剤として MBS を用いたリン酸化プリオンペプチド pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP (Fig. 1A)で免疫したマウス由来の抗血清は、ELISA で固相抗原のペプチドを認識したが(Fig. 2)、数度のクローニングを繰り返しても安定したクローンが得られなかった。抗体価が上昇した他のマウスを用いて数度の細胞融合を繰り返したが、同様に安定したクローンを樹立できなかった。

一方、架橋剤として SPDP を用いたリン酸化プリオンペプチド pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP (Fig. 1B)で免疫では、最も抗体価が上昇した1匹のマウスを最終免疫し、3日後に安楽死させたマウスから摘出した脾臓をマウスミエローマ細胞PAIと細胞融合させ、ハイブリドーマ産生抗体をELISAでスクリーニングし、数度の限界希釈法によるクローニング後、特異抗体を産生するハイブリドーマ3株、pSP240、pSP279及びpSP289を樹立した。

樹立したハイブリドーマを大量培養し、得られた培養上清に含まれる抗体の特異性をELISAで確認した。産生する抗体のアイソタイピングの結果、サブクラスは3株ともIgG (κ , γ 2b)だった(Table 1)。

次に、リン酸化プリオンペプチド[pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]又はプリオンペプチド[hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]を固相抗原とした ELISA で、抗体の特異性を調べた(Fig. 3, Table 1)。pSP279 の抗体価の比率(リン酸化プリオンペプチドの抗体価/プリオンペプチドの抗体価)は138を示し、pS43を含む配列に対する特異性が最も高かった。pSP289の比率も46と比較的高かった。一方、pSP240は高い抗体価を示したが、その比率は7で、特異性は最も低かった。

2. イムノブロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出

免疫したマウス由来の抗血清及びハイブリドーマの培養上清を用い、PrP^{Sc}感染マウス脳乳液中のpS43-PrPに対する反応性を調べた。脳内にスクレイピー(obihiro株)を接種されたマウスは、その脳内にPrP^{Sc}を蓄積し、4-5か月後に死亡する。本研究ではエンドポイント直前の4か月でマウスを安楽死させ、PrP^{Sc}感染脳及び溶液のみを投与した対照脳(mock)を調製し、イムノブロット法に

用いた。PrP^{Sc}感染脳及び対照脳ともに、6H4抗体が認識する糖鎖2本及び1本のPrPに相当するバンドを示した(Figs. 4 and 5., upper panel)。

架橋剤としてMBSを用いたリン酸化プリオンペプチドpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP (Fig. 1A)で免疫したマウス由来の抗血清は、ELISAと同様に、免疫原に用いたリン酸化セリンを含むpS43-PrPをイムノプロット法で認識し、35 kDaのバンドを示した(Fig. 4., lower panel)。抗血清が認識するこのバンドは、糖鎖2本のバンドと同じ泳動位置に認められるが、6H4抗体に比較してより明確なバンドを示し、糖鎖1本差の泳動位置には認識するバンドが示されなかった。また、対照脳(lanes 1 and 2)に比較して、PrP^{Sc}感染脳では濃いバンドを示した(lanes 3 and 4)。

一方、架橋剤にSPDPを用いたリン酸化プリオンペプチドpS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIPで免疫したマウス脾細胞から樹立したpSP279抗体を用いたイムノプロット法では(Fig. 5)、対照脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 2)ともに、6H4抗体と同様な二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した(Fig. 5., upper panel)。pSP240抗体及びpSP289抗体を用いたイムノプロット法でも、pSP279と同様なバンドを示した。

D. 考察

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料を汚染する恐れのあるPrP^{Sc}の新規検出法の確立を目的とし、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の開発に関する研究を行った。

PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリンをリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告されている(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743–8751)。ヒトPrPのN端側43残基に位置するセリン近傍のアミノ酸配列はほ乳類間で高度に保存されており、リン酸化された43残基セリン(pS43)を特異的に認識する抗体は、ウシ、ヒツジ、マウス等のPrP^{Sc}を特異的に認識することが予想される。現在、リン酸化チロシンを特異的に認識する多くの抗体が知られているが、リン酸化セリンを認識する有効な抗体はいまだ得られていない。本研究ではpS43を含むヒトPrPペプチドを合成し、pS43近傍のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体の作製を試みた。

平成22年度はマウスをpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIPで免疫し、血清の抗体価が上昇したマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行ったが、安定したクローンを樹立できなかった。抗血清はイムノプロット法でPrP^{Sc}感染脳を特異的に認識したが、ペプチドとキャリア蛋白質の架橋剤として用いたMBSを認識する抗体を多く含んでいた。樹立したハイブリドーマも、PrPでは無く、MBSを認識した。MBSはSH基を含む低分子化合物とキャリア蛋白質の結合に多用され、多くの抗体産生ハイブリドーマが樹立されているが、その構造に芳香環を含むことから、抗原性が低い免疫原ではスペーサー部分に対する抗体を誘導する。

平成23年度は架橋剤の免疫原性を下げるため、免疫原の調製には直鎖のSPDPを架橋剤として用いた。免疫したマウスの抗血清は、MBSを含む免疫原で得られた抗血清より抗体価は低かったが、スペーサー部分のSPDPではなく、pS43-hPrP (39-50)を特異的に認識した。

リン酸化プリオンペプチドに対する抗体価がプリオンペプチドに対する抗体価より高いマウス

の脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞株PAIと細胞融合を行い、3株の特異抗体産生ハイブリドーマを樹立した。その培養上清はELISAで極めて高い抗体価を示し、イムノブロット法でpS43近傍のアミノ酸配列を認識し、市販の抗プリオン蛋白質抗体6H4と同様に、PrP^{Sc}及びPrP^Cに特異的なバンドを示した。

樹立した3株のハイブリドーマは、それぞれ異なった特異性を示した。pSP279はELISAで固相のリン酸化プリオンペプチドに対する高い特異性を示し、一方でpSP240の特異性は低かった。これらpS43近傍のアミノ酸配列に対する反応性が異なる抗体を用いた検出法の構築は、リン酸化又は非リン酸化プリオン蛋白質それぞれの検出に有用と考えられる。

樹立したハイブリドーマが産生する抗体は、6H4と同様にイムノブロット法でPrP^{Sc}を認識した。しかし、PrP^{Sc}感染脳の例数が少ないことから、さらに多くの例数を検証する必要がある。その他、脱リン酸化したPrP^{Sc}感染脳のイムノブロット法や免疫蛍光法による脳切片の染色による比較等が必要である。

今年度はリン酸化プリオンペプチドに対する抗体産生ハイブリドーマを樹立したが、今後はPrP^{Sc}感染脳を免疫原として用い、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の作製を試みる。また、固相抗原としてpS43-hPrP (39-50)を用いたELISAに加え、固相抗原にPrP^{Sc}感染マウス脳を用い、より効率的な検出法の確立を予定している。

今後はスクレイピーのマウス脳内投与による伝達実験を行い、スクレイピー感染脳を抗原としたニワトリへの免疫による異常プリオン蛋白質特異的ニワトリ抗体の調製を予定している。

E. 結論

本研究ではPrP^{Sc}の新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてヒトpS43-PrP免疫原の作製、ハイブリドーマの樹立、産生するモノクローナル抗体の特異性をELISAおよびPrP^{Sc}感染マウス脳を用いたイムノブロット法で行った。これらの結果は、新たなPrP^{Sc}バイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 菊池裕、豊田淑江、遊佐精一、中島治、手島玲子、小西良子、山口照英：低酸素条件下で誘導されるGPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の発現に関与する因子の解析、第83回日本生化学会大会、平成22年12月7-10日、神戸市

2. 東原知宏、菊池裕、中島治、手島玲子、辻勉*、小西良子、山口照英：ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質mRNAの発現解析、第83回日本生化学会大会、平成22年12月7-10

日、神戸市

3. Y. Kikuchi, T. Kanayasu-Toyoda, O. Nakajima, S. Yusa, T. Higashihara, T. Tsuji, R. Teshima, Y. Sugita-Konishi, T. Yamaguchi: Identification of a splice variant of prion protein mRNA lacking the GPI anchor signal sequence in bovine and sheep brain, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Neurodegenerative Diseases: The Molecular and Cellular Basis for Neurodegeneration, Feb. 21-26, 2011, Taos, New Mexico, USA
4. 東原 知宏、菊池 裕、中島 治、手島 玲子、辻 勉、小西 良子、山口 照英：ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質mRNAの解析、日本薬学界第131年会、平成23年3月28-31日
5. 遊佐精一、菊池裕、小西良子、山口照英：Molecular characterization of mouse, human, bovine, and sheep PrP^C in cell lines.、Asian Pacific Prion Symposium 2011、平成23年7月10-11日、軽井沢町
6. 東原知宏、菊池裕、中島治、遊佐精一、手島玲子、辻勉、小西良子、山口照英：ヒツジOA1細胞が発現するスプライス変異型プリオン蛋白質遺伝子の解析、第84回日本生化学会大会、平成23年9月20-24日、京都市
7. Yutaka Kikuchi, Sei-ichi Yusa, Toshie Kanayasu-Toyoda, Osamu Nakajima, Reiko Teshima, Yoshiko Sugita-Konishi, Teruhide Yamaguchi: Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G, Keystone Symposia, Advances in Hypoxic Signaling: From Bench to Bedside, February 12 - 17, 2012, Banff, Alberta, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

広島大学広島大学大学院 生物圏科学研究科

免疫生物学研究室 青笹正義

国立医薬品食品衛生研究所

代謝生化学部 中島治

衛生微生物部 遊佐精一

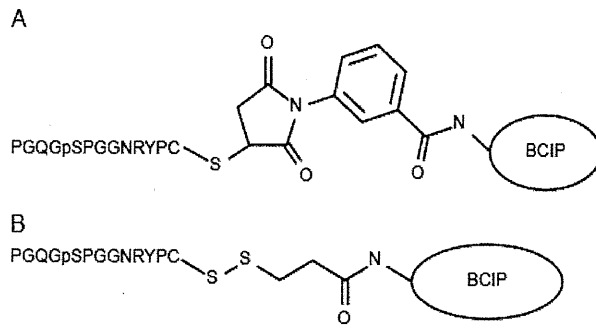


Fig. 1. Schematic diagram of antigens.

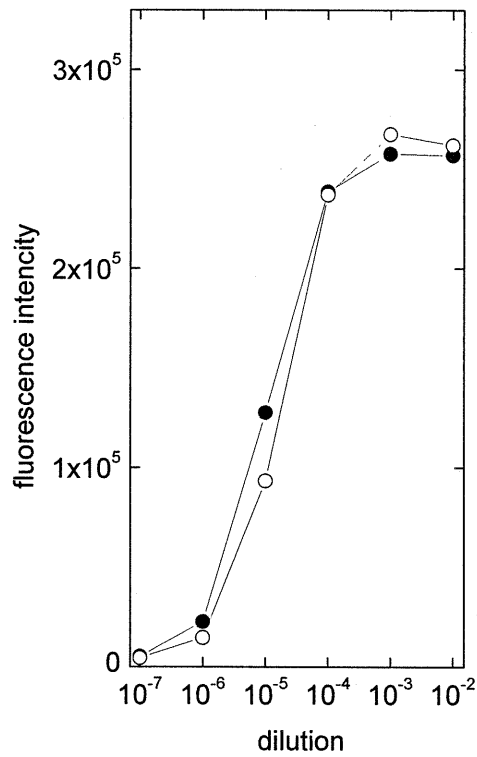


Fig. 2. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP mouse serum were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen.

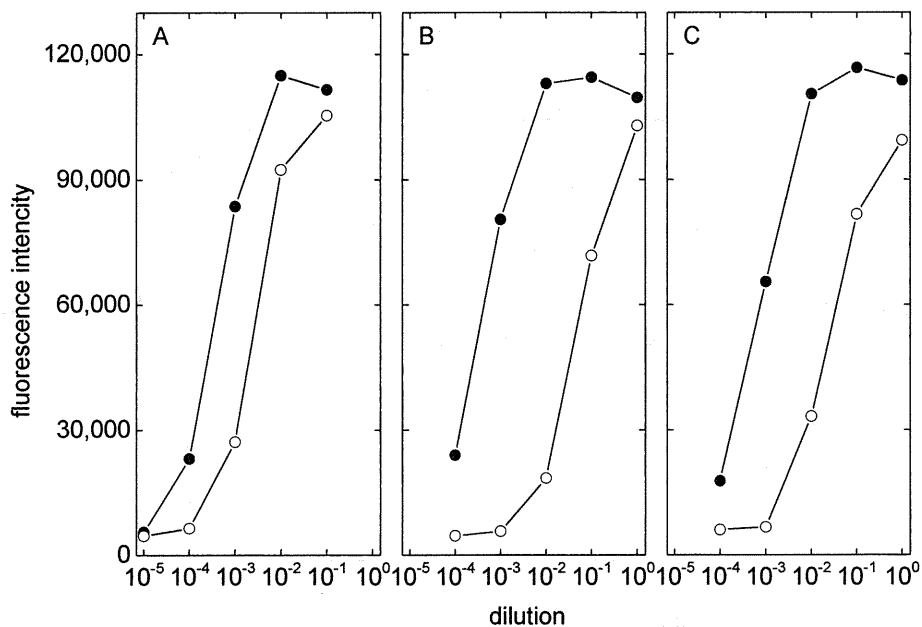


Fig. 3. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.

Table 1. 抗リン酸化プリオン蛋白質抗体の特異性

抗体	抗体価			比率
	アイソタイプ	固相抗原		
		リン酸化プリオン	プリオンペプチド	
pSP240	$\kappa, \gamma 2b$	2,222	333	7
pSP279	$\kappa, \gamma 2b$	2,500	18	138
pSP289	$\kappa, \gamma 2b$	1,429	31	46

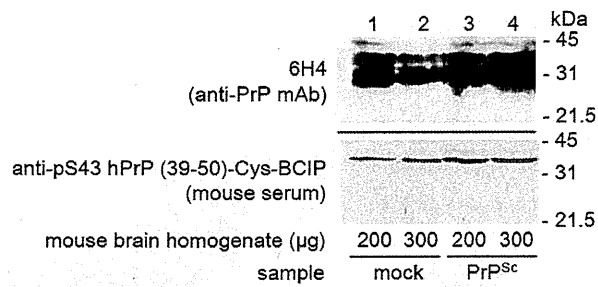


Fig. 4. Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lanes 1 and 2) and PrP^{Sc} (lanes 3 and 4) were detected with anti-PrP mAb 6H4 (upper panel) and anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP mouse serum (lower panel).

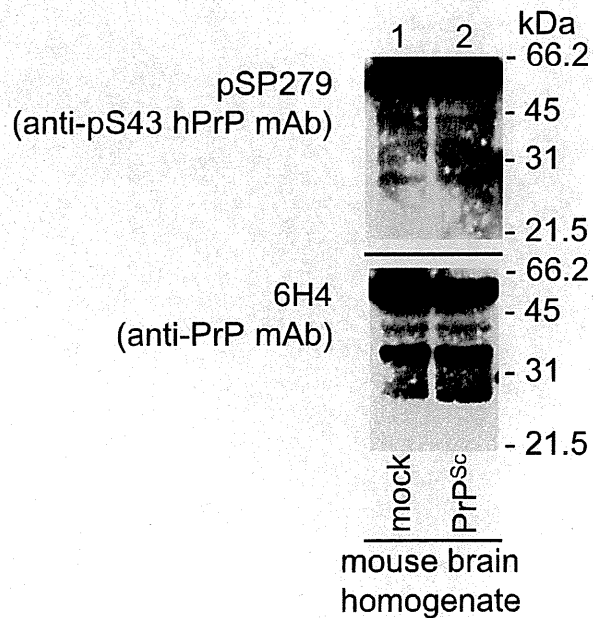


Fig. 5. Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1) and PrP^{Sc} (lane 2) were detected with anti-pS43 hPrP mAb pSP249 (upper

panel) and anti-PrP mAb 6H4 (lower panel).

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良	バイオ医薬品におけるプリ オンの問題－ヒト赤血球を 原料とする人工酸素運搬体 をめぐる問題－	人工血液	18	142-150	2011
Tsujikawa, M., Ohkubo Y., Masuda, M., Tanaka, H., Takahashi, K., Sasaki, Y., Yunoki, M., Ikuta, K.	Caution in evaluation of removal of virus by filtration: Misinterpretation due to detection of viral genome fragments by PCR	J. Virol. Methods	178	39-43	2011
Sakudo, A., Ano, Y., Onodera, T., Nitta, K., Shintani, H., Ikuta, K., Tanaka, Y.	Fundamentals of prions and their inactivation	<i>Int. J. Mol. Med.</i>	27	483-489	2011
Sakudo, A., Xue, G., Kawashita, N., Ano, Y., Takagi, T., Shintani, H., Tanaka, Y., Onodera, T., Ikuta, K.	Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation	<i>Curr. Protein Pept. Sci.</i>	11	166-179	2010