

[2]

氏 名 (本籍)	武木田 薫 (東京都)		
学 位	博士 (学術)		
学位記号番号	博甲第19号		
学位授与年月日	平成14年3月8日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
論 文 題 目	抗ペプチド抗体を用いたプリオン蛋白質の高感度 検出法の開発		
論文審査委員	(主査)	教 授 谷村 顕雄	
		教 授 小此木 成夫	
		教 授 木村 修一	
		教 授 戸谷 誠之	
		国立医薬品食品衛生研究所 微生物部長 棚元 憲一	

論 文 要 旨

〔背景〕

プリオン病は伝達性海綿状脳症の総称で、生体内の正常プリオン蛋白質 (PrP^C) が異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) に変化して脳に蓄積すること等により発症し、ヒツジのスクレイピーやウシの海綿状脳症 (BSE) などが知られている。ヒトのプリオン病には40-50歳代以降に発症するクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 等が知られているが、近年、従来のCJDとは異なり、若年層で発症する変異型CJDが報告されている。変異型CJDはその大多数がBSEが大発生したイギリスで報告されていることから、ウシ PrP^{Sc} で汚染された食品や食品原料の喫食により、BSEがウシからヒトに伝播した可能性が疑われている。よって、食品及び食品原料の PrP^{Sc} 汚染を簡便、迅速且つ高感度に検出可能な方法が求められている。

PrP^{Sc} の検出法にはバイオアッセイとイムノアッセイがある。バイオアッセイは試料を動物の脳内に接種して発症をみる方法で、その特異性は高く高感度だが、判定までに時間を要する。一方、イムノアッセイには酵素免疫法 (EIA, ELISA) やイムノブロット法があり、簡便、迅速に測定できるが、その感度はバイオアッセイの1/1000程度である。現在、BSEの検査キットに使われているイムノアッセイは PrP^{Sc} が高濃度に蓄積する延髄等を検体とした動物用体外診断薬であり、食品及び食品原料の PrP^{Sc} 汚染を検出する方法は確立されていない。

以上より、本研究では食品及び食品原料の PrP^{Sc} 検出法の確立を目的とし、抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用いたイムノアッセイへのウシ由来試料の適用を試みた。

〔本研究の概要〕

第1章

抗ウシ・プリオンペプチド抗体の調製を行い、その抗体の特異性を PrP^C を含むウシ大脳

試料を標準物質として用いたイムノブロット法で確認した。

第2章

組換えウシ・プリオン蛋白質 (rBoPrP) の大腸菌発現系を構築し、標準物質として用いる rBoPrP を調製した。先に特異性を確認した抗体を用いたイムノブロット法で rBoPrP の性状を確認した。また、イムノブロット法でウシ大脳由来試料中の PrP^C の定量を検討した。

第3章

rBoPrP を標準物質として用いた競合的 ELISA を構築し、ウシ大脳由来試料中の PrP^C の定量を検討した。また、ウシ由来食品試料に対する rBoPrP の添加実験を行い、競合的 ELISA への食品試料の適用を検討した。

〔方法〕

第1章

ウシ・プリオン蛋白質のペプチドを免疫原として用いたマウス・モノクローナル抗体及びウサギ抗血清の IgG 画分を調製した。得られた抗体の特異性は、ウシ大脳由来試料を用いたイムノブロット法で確認した。

第2章

ウシ・プリオン蛋白質 cDNA コード領域配列を RT-PCR 法でホルスタイン系ウシ大脳 mRNA から調製して発現プラスミドを構築し、大腸菌で rBoPrP を封入体として発現させた。尿素で可溶化した封入体を Cu²⁺キレートカラムで精製し、尿素濃度を順次下げながら透析して巻き戻し処理を行い、rBoPrP を得た。rBoPrP の性状は、マウス・モノクローナル抗体 BSPX54を用いたイムノブロット法で確認した。rBoPrP を標準物質として用いたイムノブロット法を行い、ウシ大脳由来試料中の PrP^C 量を求めた。

第3章

固相抗原として rBoPrP を吸着させた96穴プレートに、検体の存在下で第1抗体のウサギ抗血清 BPN1を結合させた。洗浄後、第2抗体の β -galactosidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を第1抗体に結合させた。洗浄後、基質の 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside を加え、固相に結合した抗体量を蛍光強度として測定した。ウシ大脳由来試料中の PrP^C 量は、哺乳類プリオン蛋白質を含まない魚脳粗抽出物に rBoPrP を添加して作製した検量線から求めた。また、ウシ大脳皮質、大腸及び挽肉に対する rBoPrP の添加実験を行い、構築した競合的 ELISA への食品試料の適用を評価した。

〔結果及び考察〕

第1章

調製したウサギ抗ウシ・プリオンペプチド抗体 BPN と BPC は、イムノブロット法でウシ灰白質 P2画分中の糖鎖の付き方の異なるそれぞれのプリオン蛋白質 (PrP) を認識した。これら抗体は、既存のマウス抗ウシ・プリオンペプチド抗体 BSPX54と同様の特異性を示した。

第2章

rBoPrP の大腸菌発現系を構築し、標準物質としての rBoPrP を得た。SDS-PAGE を行い、

銀染色で26kDa に1本のバンドを確認した。また、BSPX54を用いたイムノブロット法で、糖鎖切断処理したウシ大脳皮質及び灰白質粗抽出物並びに P2 画分中の PrP^C と同様の反応性を示した。

rBoPrP を標準物質としたイムノブロット法を行い、その検量線からウシ大脳皮質粗抽出物及び P2 画分中の PrP^C の定量が出来た。この系は試料を糖鎖切断処理することでより正確な定量値が得られ、従来の定量法よりも簡便、迅速に PrP の定量が可能である。

第3章

調製した抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用い、競合的 ELISA の条件検討を行った。rBoPrP はウサギ抗血清 BPN 及び BPC に対する阻害活性を示したが、BSPX54 に対して阻害活性を示さなかった。固相抗原への結合を阻害する rBoPrP の濃度が最も低い値を示した BPN1 を選択し、以降の実験を行った。マグロ脳粗抽出物中に rBoPrP を添加した競合的 ELISA を行い、12ng から 1,200ng の範囲 (10nM-1,000nM) が測定可能な検量線を得た。作製した検量線から、ウシ大脳皮質粗抽出物及び P2 画分中の PrP^C を測定し、その値はイムノブロット法の測定結果及び既存の報告値とほぼ同等だった。ウシ由来試料に対する rBoPrP の添加実験を行い、この系への食品試料の適用を評価した。ウシ大脳皮質粗抽出物を用いて標準添加法から求めた PrP^C 量は先に求めた値とほぼ一致した。ウシ大腸抽出物を用いたときには添加量よりも低い値を、ウシ挽肉抽出物を用いたときには添加量の約 2 倍の値を示した。本研究で用いた食品試料中には ELISA を妨害する成分が存在し、その妨害様式も一様ではなかった。従って食品等の PrP 含量が低い試料への適用には、測定下限値を引き下げするための試料の前処理や PrP の濃縮が必要と思われる。モデル試料として rBoPrP を用いた ELISA は感染性の PrP^{Sc} を使わずに妨害物質除去等の予備検討への利用が可能な簡便な試験法で、モデル試料の動物種を換えた ELISA の構築も容易に想定できる。様々な家畜由来食品の PrP^{Sc} 汚染の測定法を開発する上で、前処理法や PrP の濃縮法の検討にも役立つと考えられる。

審査報告要旨

(背景)

1986年英国で初めて確認された牛海綿状脳症 (BSE) の第1波は、1992年英国で37,000頭が発症、第2波は変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (v-CJD) の発生で、英国で111名発症、うち102名死亡。第3波は1999年、従来 BSE の発生が認められなかったイタリア・スペイン・ドイツなどで BSE が発生した。2001年9月には東アジアでは初めて日本で3頭の発症が認められた。

現在のところ v-CJD 患者は、英国111名、フランス4名、アイルランド1名が確認されているが、潜伏中の感染者数は推定できない。

本研究は1998年9月、当時日本ではまだ問題にならなかった BSE 感染牛が今後輸入されたり、あるいは汚染飼料が輸入された場合に、短時間で感染 (伝達) の有無を判定し得る

方法が必要になるとの判断から、研究課題として取り上げた。

異常プリオンの検出法としては、バイオアッセイ法とイムノアッセイ法とに大別される。前者は高感度であるが長期間を要する欠点があり、後者は短期間で結果が得られるが感度は著しく低い。本論文では牛を原料とする食品（牛肉、牛肉製品、牛乳、牛脂製品など）中のプリオンの分析を目的とし、従来法よりも簡便、迅速、高感度で結果が得られるイムノアッセイ法の確立を試みた。牛肉、牛乳、牛脂などを原料とした食品を分析対象とした場合には、骨髄、回腸、大脳などに比べプリオン含量は極めて低いので技術的にはかなりの困難を伴い、在来法に比し特に優れた結果は得られなかった。一方、プリオン含量の比較的多い検体については高感度の結果を得ることができた。

〔研究概要〕

1. 抗ウシ・プリオンペプチド抗体を作成し、イムノブロット法によりその特異性を確認した。これは膜上で固相の変性プリオン蛋白を抗体に認識させる方法である。
2. イムノブロット法における rBoPrP の反応性を指標として、牛大脳試料中の正常プリオン蛋白質を定量できる系を作成した。この系は従来法の定量法に比し新規性に富み、操作簡便で迅速な定量が可能である。
3. rBoPrP を標準物質とした競合的ELISAを構築し、牛大脳に含まれる正常プリオン蛋白質を定量しうる系を作成した。別に牛由来の食品への組換え牛プリオン蛋白質の添加実験を行い、競合的ELISAへの食品試料の適用を試み、その有効性を確認した。次いで rBoPrP を標準物質とした競合的ELISAを作成し、牛大脳試料中に含まれる正常プリオン蛋白質の定量に成功した。
4. 未だ分析法の確立されていない食品あるいは食品原料中のプリオン蛋白質の定量に有効な分析法の作成にほぼ成功し、本研究で構築した各種の方法を駆使すれば、より高感度の系の開発は可能であると思われる。

本研究はプリオン蛋白質の高感度検出法を新たに開発し、また従来統一されていなかった検出法の骨子を作成したものとして、十分に評価することができる。

以上の結果、審査員一同は、本論文を博士（学術）の学位論文として価値があるものと認めた。