

成績概要書 (2006 年 1 月作成)

課題分類:

研究課題: 高感度で簡便な異常プリオン蛋白質検出法

(異常プリオン蛋白質の高感度で簡便な検出法の開発)

担当部署: 道立畜試 畜産工学部 遺伝子工学科・感染予防科・代謝生理科

協力分担: 農研機構 動物衛生研 感染症研究部 細菌病研究室、北大大学院 獣医学研究科プリオン病講座、栄研化学株式会社 生物化学研究所、(株)ジェネティックラボ 研究開発部

予算区分: 道費 (牛海綿状脳症対策技術開発費)

研究期間: 2002 ~ 2005 年度 (平成 14 ~ 17 年度)

1. 目的

牛海綿状脳症 (BSE) のスクリーニング検査には、現在 ELISA 法が用いられているが、生前診断や牛由来製品の安全確認などに、さらに高感度で簡便な異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) 検出技術の開発が求められている。本試験では、ウシ型プリオン蛋白質 (ウシ PrP) に対するモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、ルシフェラーゼの生物発光法を原理とする PrP^{Sc} の検出法を開発する。

2. 方法

- 1) 既存のモノクローナル抗体を用いたプリオン蛋白質検出法の検討
- 2) 抗ウシ型プリオン蛋白質モノクローナル抗体の作製
- 3) 磁性粒子を用いた生物発光法によるウシ型プリオン蛋白質検出法の開発
- 4) BSE 感染脳組織を用いた市販 BSE 検査用 ELISA キットとの比較検討

3. 成績の概要

- 1) 磁性粒子を用いた生物発光法 (磁性粒子 BL 法: 図 1) は、既存の抗マウス PrP mAb を用いた ELISA 法およびプレートを用いた BL 法より、ウシ型組換えプリオン蛋白質 (ウシ re-PrP) および正常牛の脳乳剤に対する反応性が高く、プリオン蛋白質検出法として優れていた。
- 2) 大腸菌による蛋白質発現によりウシ re-PrP を作製した。このウシ re-PrP を免疫したマウスの脾臓細胞と NS1 細胞を融合させ、12 株の抗体産生細胞株を樹立した。これらの細胞からモノクローナル抗体 (1b ~ 12b) を作製した。ウシ re-PrP および正常脳乳剤を抗原とするラジオイムノアッセイの結果、高い反応性を示す捕捉用抗体と検出用抗体の 4 つの組合せを見出した。
- 3) 抗体を磁性粒子 BL 法へ応用したところ、捕捉用抗体 6b と検出用抗体 2b の組合せはウシ re-PrP および脳乳剤への反応性が高かったため、ウシ PrP 測定用抗体とした。磁性粒子 BL 法は、マウス PrP に比べ、ウシ PrP への反応性が高かった。BSE 感染脳乳剤に対して、陰性対照である標準液に比較し有意に高く、PK 抵抗性プリオン蛋白質の検出が可能であった (図 2)。PK 処理後の BSE 脳乳剤を感作させた磁性粒子をウエスタンブロット法で PrP の検索を行ったところ、約 27kd に PrP を検出した (図 3)。
- 4) BSE 感染牛の脳組織を用いて市販の BSE 検査用 ELISA キットと比較したところ、磁性粒子 BL 法は、他の検査法よりもすべての希釈倍率で感度を上回り (図 4)。また検査に必要な合計所要時間は約 2 時間 45 分であり、ELISA キットの約 2/3 であった (表 1)。

これらのことから、本課題で作製した抗ウシ mAb を用いた磁性粒子 BL 法は、BSE 感染脳組織から微量の PrP^{Sc} を検出することができ、市販の BSE 検査用 ELISA キットより高感度で、また検査時間が短いなどの利点を有し、将来 BSE の診断法への応用が期待される。

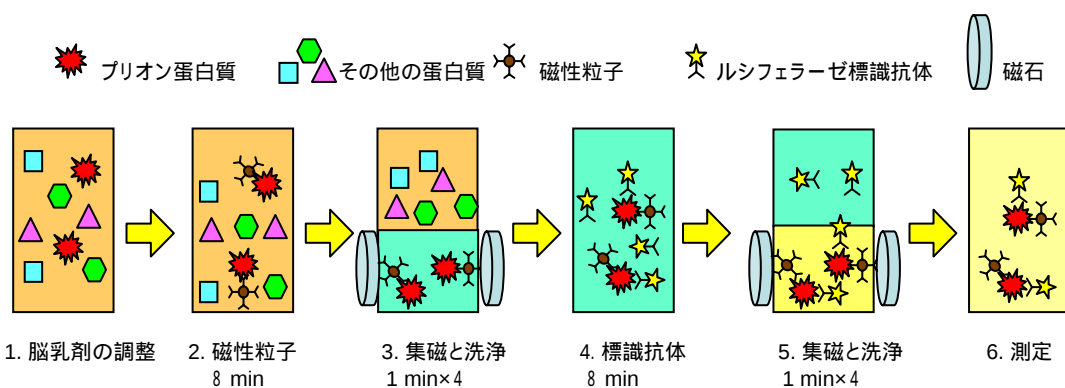


図1 磁性粒子 BL 法の原理と手順

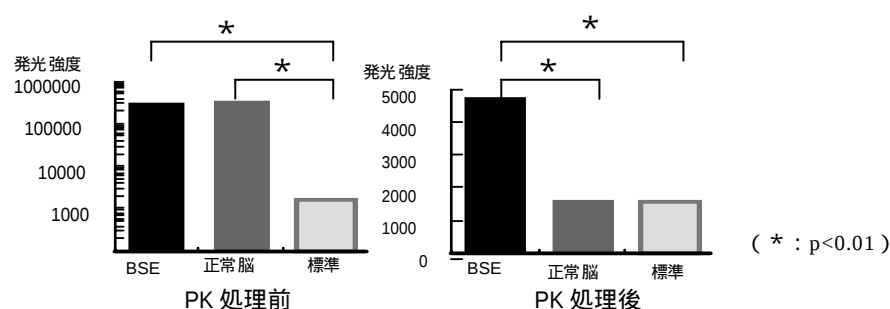


図2 BSE 感染脳からのプロテイナーゼ K 抵抗性プリオン蛋白質の検出

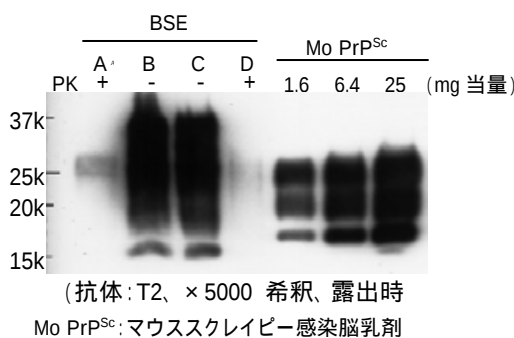


図3 ウェスタンブロット法による磁性粒子からのプリオン蛋白質の検出

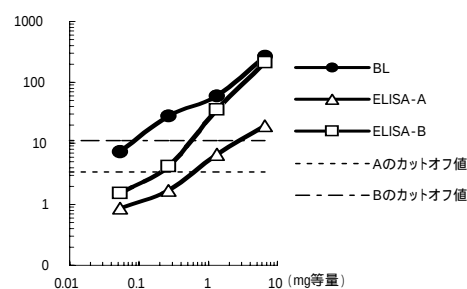


図4 BSE 感染脳に対する検出感度比較

表1 磁性粒子 BL 法と主な BSE 検査法の比較

	磁性粒子 BL 法	ELISA キット A	ELISA キット B	ウェスタンブロット法
前処理時間	約 2 時間	約 1 時間	約 2 時間	約 3 時間
検出操作時間	約 45 分	約 3 時間 30 分	約 2 時間	約 5 時間
合計所要時間	約 2 時間 45 分	約 4 時間 30 分	約 4 時間	約 8 時間

I V . 成果の活用面と留意点

- 1) 本法は異常プリオン蛋白質の高感度で迅速な測定法であり、BSE における異常プリオン蛋白質の体内分布の解析等に用いることができる。
- 2) BSE 感染脳乳剤や感染性材料の取り扱いには、バイオセーフティ基準 3 に準拠した実験室を必要とする。

V . 残された問題点とその対応

若齢牛にも対応した超高感度プリオン検出技術の開発と生前診断を目指した BSE マーカー物質の検索