

成績概要書（2010 年 1 月作成）

研究課題：BSE 診断における磁性粒子 BL 法の検証と診断マーカーの探索（314681）

担当部署：道立畜試 基盤研究部 遺伝子工学科・感染予防科・病態生理科・受精卵移植科
協力分担：動物衛生研究所プリオン病研究センター、北海道大学大学院 プリオン病学講座、

帯広畜産大学 家畜病理学教室、岐阜大学 食品環境衛生学教室、栄研化学

予算区分：道費（重点領域）

研究期間：2006～2008 年度(平成 18～20 年度)

1. 目的

牛海綿状脳症（BSE）の診断は、異常プリオン蛋白質（PrPSc）の検出によって行われるが、PrPSc 蓄積機序の解明や BSE の生前診断は今なお困難である。安全で安心できる北海道産畜産物の供給と BSE の早期清浄化を図るため、これまでに開発した磁性粒子 BL 法の実用性の検証および生前診断のための BSE 診断マーカーの探索を行った。

2. 方法

1) 異常プリオン蛋白質検出技術の検証

（1）国内 BSE 患者 5 頭および脳内接種 BSE プリオン感染牛 12 頭の脳を用いた。磁性粒子 BL 法により PrPSc を検出するとともに、ELISA 法またはウェスタンブロット(WB)法と比較検討した。

（2）PrPSc の難溶性を利用した脳からの蛋白質抽出法について、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の有機溶剤 3 種の抽出効率を ELISA 法と WB 法により検討した。

（3）BSE プリオン感染脳を試料として超音波処理を行い、その反応産物中の PrPSc 検出を磁性粒子 BL 法により行った。

2) BSE 診断マーカーの探索

BSE プリオン感染牛 4 頭および非感染牛 1 頭（受精卵クローン双子 1 組を含む）を用い、血液学的検査、白血球サブポピュレーションおよびマイクロアレイによる白血球 mRNA 発現について解析した。

3. 成果の概要

1)（1）国内 BSE 患者 5 頭の脳 5mg 組織等量を用いた磁性粒子 BL 法によりすべての患者から PrPSc を検出した（図 1-A）。磁性粒子 BL 法と ELISA 法の値には高い相関があった（図 1-B）。蓄積初期段階の状態である脳内接種後 12 ヶ月の BSE プリオン感染牛の脳は、WB 法では長時間露光によりようやく検出が可能な PrPSc 量であったが（図 2-A）、磁性粒子 BL 法では WB 法に比べ 1/2 の検体量で確実に検出できた（図 2-B）。磁性粒子 BL 法は、解析した BSE プリオン感染牛 17 頭すべてから PrPSc の検出が可能であり、磁性粒子 BL 法が BSE 診断に有効であることが確認された。

（2）比較した有機溶剤 3 種のなかでは従来用いられているブタノール液の蛋白質抽出効率が高かった。

（3）磁性粒子 BL 法は、超音波処理した BSE プリオン感染試料に対して処理前に比べ高い反応を示した。超音波処理と磁性粒子 BL 法の組合せが良好であることが示唆された。

2) BSE 診断マーカーの探索において、BSE プリオン感染牛の血液学的検査、白血球サブポピュレーション解析では、BSE プリオン接種に伴う特異的な変化はみられなかった（図 3）。マイクロアレイ解析による白血球 mRNA 発現において、1 対の受精卵クローン牛の間で BSE プリオン接種後に差の見られた遺伝子があった（表 1）。

以上のように、磁性粒子 BL 法は、発症前の蓄積初期段階の微量な PrPSc でも WB 法と同様に検出でき、BSE 診断に有効であることが検証された。また BSE プリオン感染牛の白血球解析結果から生前診断のための基礎知見を得た。

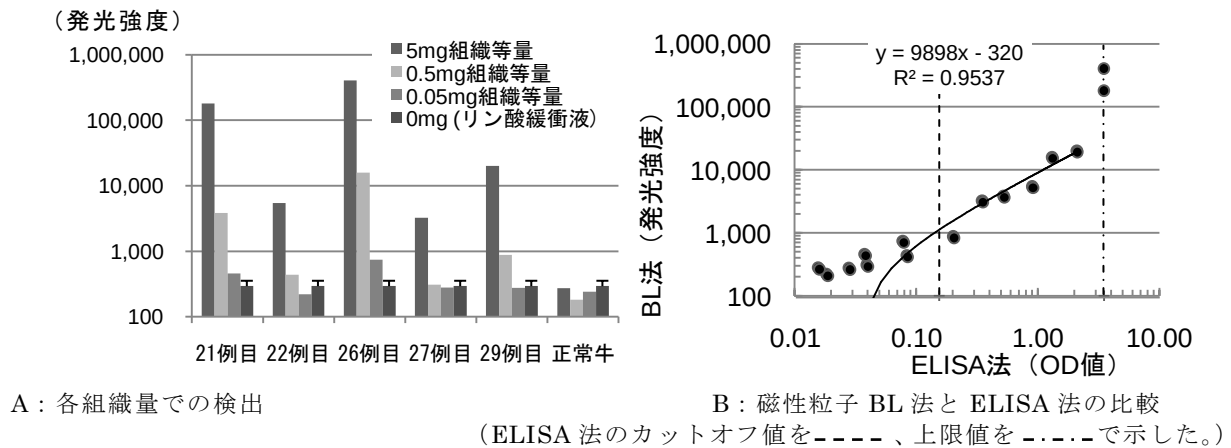


図 1 道内 BSE 患畜脳を用いた磁性粒子 BL 法による PrPSc 検出

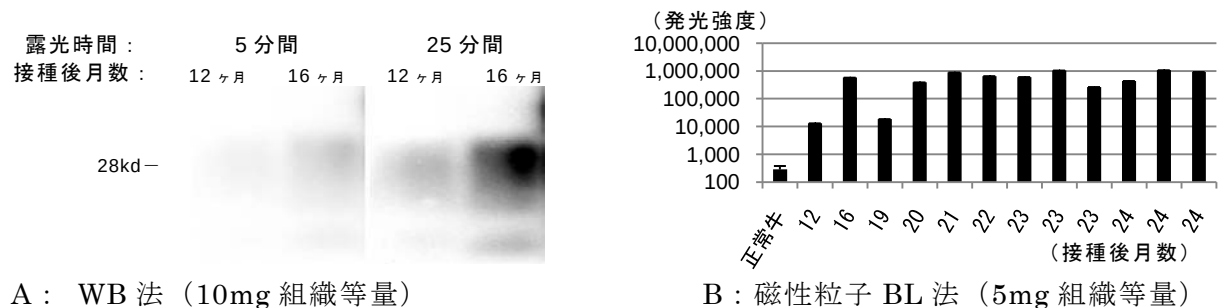


図 2 脳内接種による BSE プリオン感染牛の脳を用いた PrPSc 検出

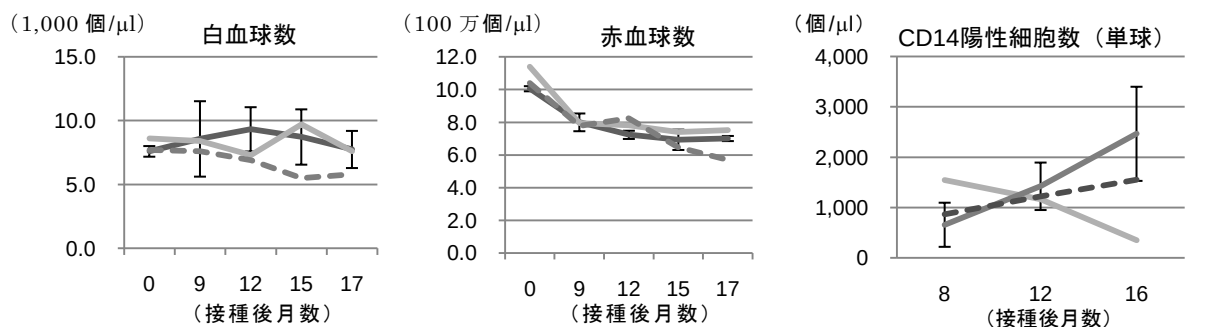


図 3 BSE プリオン感染牛の血液学的検査および白血球サブポピュレーション解析結果

表 1 BSE プリオン感染牛と非感染牛 (※) の白血球において発現に差がみられた遺伝子

BSE プリオン感染牛で発現が増加	接種後 6、12、17 か月が多い	なし	—
	接種後 6 か月で差がなく、12、17 か月が多い	なし	—
	接種後 6、12 か月で差がなく、17 か月が多い	10 種	toll-like receptor 3 など
BSE プリオン感染牛で発現が減少	接種後 6、12、17 か月で少ない	1 種	similar to SRXN1
	接種後 6 か月で差がなく、12、17 か月で少ない	2 種	chromosome 10 ORF など
	接種後 6、12 か月で差がなく、17 か月で少ない	4 種	polypeptide 4c1 など

※ 1 対の受精卵クローン牛である No.4000 と No.4017 を比較

4. 成果の活用面と留意点

本課題の成果は、BSE の生前診断および発症機序の解明のための研究に用いられる。

5. 残された問題とその応用

BSE の生前診断法の開発と発症機序・病態解明。