

世界で初めて BSE 牛の唾液からプリオン検出 プリオン病の防除技術の開発

SATテクノロジー・ショーケース2014

1. 研究の目的と背景

牛海綿状脳症(BSE)や羊スクレイピー、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)などのプリオン病は、長期間の潜伏期を経て、脳にスポンジ状の変化が出現する致死性の疾患です。プリオン病の病原体は、正常プリオン蛋白質の構造が変化した異常プリオン蛋白質です。プリオン病の診断には異常プリオン蛋白質の検出が鍵となりますが、正常プリオン蛋白質と区別しなければなりません。また異常プリオン蛋白質は脳に蓄積しますが、それ以外の組織ではみつけることができませんでした。

BSEは汚染した食肉を介してヒトに感染し、変異型CJDを発生したことから、家畜衛生上のみならず、公衆衛生上も重要な問題となりました。われわれは、プリオン病の診断法の高度化を目指して、これまでに検出できなかった微量のプリオンを高感度に検出する手法の開発と異常プリオン蛋白質のみと反応する抗体の開発を試みました。

2. 研究内容

1) BSE異常プリオン蛋白質の試験管内増幅技術の開発

異常プリオン蛋白質は、Protein misfolding cyclic amplification (PMCA)という生化学的な方法で増幅することが可能です(図1)。スクレイピー感染動物では、この方法を用いて、血液や尿からも異常プリオン蛋白質が検出されており、早期診断や生前診断に応用できることが示されています。従来の方法ではBSEの異常プリオン蛋白質を効率良く増幅することはできませんでしたが、デキストラン硫酸化合物を増幅反応液に添加することで、増幅効率を劇的に改善することができました。

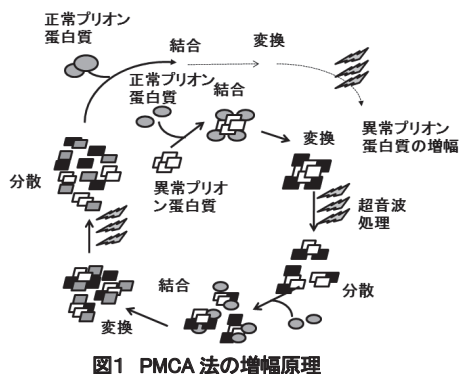


図1 PMCA法の増幅原理

●検出感度－10万倍以上向上

本法は、100万倍に希釈した脳乳剤からも異常プリオン蛋白質を検出レベルにまで増幅しました。増幅を2回行くと、10億倍ないし100億倍に希釈したサンプルからも異常プリオン蛋白質が検出されます(図2左)。このことから、開発した手法の検出感度は、常法のウエスタンブロットに比べて1億倍以上、感度が良いとされるマウスへの伝達試験に比べても10万倍以上向上しています(図2右)。

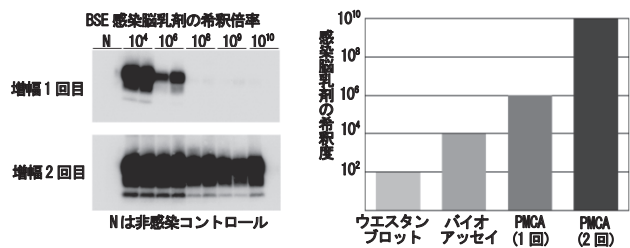


図2 PMCA法によるBSEプリオンの検出感度

●BSE感染牛の体内からの微量なプリオンの検出

本手法によりBSE感染牛におけるプリオンの分布を解析したところ、発症期には広範な組織に極微量の異常プリオン蛋白質が分布することが示唆されました(図3)。唾液腺から異常プリオン蛋白質が検出されたことから、唾液を用いた診断の可能性が示されました。

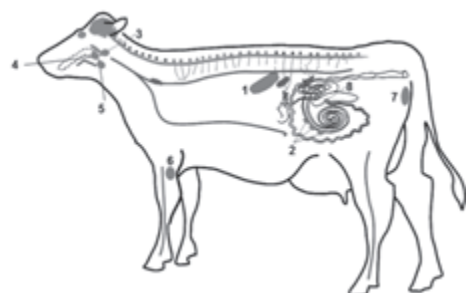


図3 BSE発症牛における異常プリオン蛋白質の分布

赤色部位: 特定危険部位、青色部位: すでに異常プリオン蛋白質が見つかった末梢神経など、緑色部位: PMCAにより新たに異常プリオン蛋白質が確認された部位。
1: 脾臓、2: 腸間膜リンパ節、3: 外側咽頭リンパ節、4: 舌根、5: 唾液腺、6: 上腕三頭筋、7: 半腱様筋、8: 回盲部。

代表発表者 横山 隆 (よこやま たかし)
所 属 農研機構・動物衛生研究所
インフルエンザ・プリオン病研究センター
問合せ先 〒305-0856 つくば市観音台3-1-5
TEL: 029-838-7708 FAX: 029-838-7709

■キーワード: (1) プリオン
(2) 牛海綿状脳症
(3) と畜前診断法
(4) 異常蛋白質

SATテクノロジー・ショーケース2014

● 唾液を用いたBSEのと畜前診断

BSE経口実験感染牛から唾液を採取し、本法により調べたところ、3頭のうち1頭は発症前2ヶ月(経口接種後63ヶ月)から、他の2頭は発症時あるいは発症初期(経口接種後65ヶ月と83ヶ月)以降にBSE異常プリオン蛋白質が検出されました(図4)。

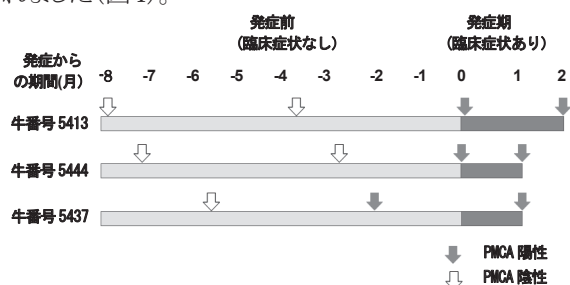


図4 経口感染牛における唾液中プリオンの検出時期

2) 異常プリオン蛋白質と選択的に結合する抗体の作成

これまでプリオン病の診断に用いられてきた抗体は、同じアミノ酸配列を有する異常プリオン蛋白質と正常プリオン蛋白質のどちらにも結合しました。両者の識別には、異常プリオン蛋白質の蛋白質分解酵素抵抗性を利用して

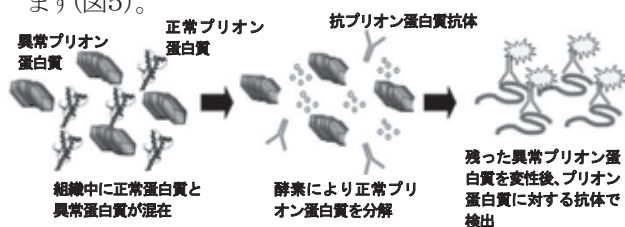


図5 従来の異常プリオン蛋白質の検出

異常プリオン蛋白質と選択的に結合する抗体の作製により、この酵素処理を省略することができ、診断の迅速化を可能とします。加えて、異常プリオン蛋白質の立体構造を明らかにすることにも活用できます。プリオン蛋白質を持たない遺伝子変異マウスに異常プリオン蛋白質を免疫して、異常プリオン蛋白質の立体構造を認識する(異常プリオン蛋白質とは結合するが、正常プリオン蛋白質とは反応しない)複数の抗体を作製しました。

● 新規抗体を用いた新たなプリオン検出法

新規の抗体と固相酵素免疫検定法(ELISA)を組み合わせた異常プリオン蛋白質の凝集体検出法 Multimer Detection System with prion specific antibodies (SMDS)」を開発しました(図6)。この手法は、従来の酵素処理を省略することで検出に要する時間を短縮できるほか、多検体処理への応用も可能です。



図6 SMDSによる異常プリオン蛋白質凝集体の検出

3. 研究成果・技術開発の要点

世界で初めて、BSE感染牛の唾液から異常プリオン蛋白質を検出しました。また、異常プリオン蛋白質の立体構造を認識する抗体パネルを作製し、プリオン病の診断の高度化を図りました。BSE診断や牛由来産物の安全性評価への応用が可能となりました。

4. 実用化状況・今後の展開など

BSEプリオンの増幅技術により、感染牛を早期に発見できる可能性があるほか、牛肉や牛を原材料とする食品、肉骨粉などの安全性評価等への活用が期待されます。生きている動物のプリオン病の診断法は確立されていません。唾液を用いた検査は、変異型CJDを含めたヒトのプリオン病の診断を含めて、非侵襲性のプリオン診断法として期待されます。

5. 関連情報

- 1) 特許第5209712号
PLoS One 5(10): e13152, 2010.
Emerg. Inf. Dis. 18(12):2091, 2012.
- 2) J. Biol. Chem.285(16):11931, 2010.
PLoS One 8(2): e58013, 2013.