

# 研究業務の紹介

## PMCA法による異常プリオン蛋白質の高感度検出法の開発

MURAYAMA Yuichi

プリオン病研究センター 上席研究員 村山 裕一

牛海綿状脳症(BSE)や羊のスクレイピー、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病などプリオン病は、感染性を持った異常プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)により引き起こされると考えられています。PrP<sup>Sc</sup>は神経系組織などに発現されている正常プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)が何らかの原因で蛋白質の立体構造が変化し、その結果病原性を獲得するに至ったと考えられます。PrP<sup>Sc</sup>は蛋白分解酵素に抵抗性を示すので、酵素消化後、エライザ法やウェスタンブロット(WB)法など免疫学的手法を用いて検出するのが一般的です。また、試験管内でPrP<sup>Sc</sup>を増幅して検出する高感度法も開発されており、大腸菌由来の組換え型プリオン蛋白質を用いてアミロイド形成を検出する方法や、超音波処理を繰り返しプリオン蛋白質の構造変換を誘導するPMCA (protein misfolding cyclic amplification)法などがあります。PMCA法では増幅産物にも感染性が認められることから、増幅対象がPrP<sup>Sc</sup>であることが明白であり、指数関数的増幅に成功した場合、超高感度にPrP<sup>Sc</sup>を検出できることから、我々はPMCA法を用いた家畜プリオン病の診断法の開発を進めています。

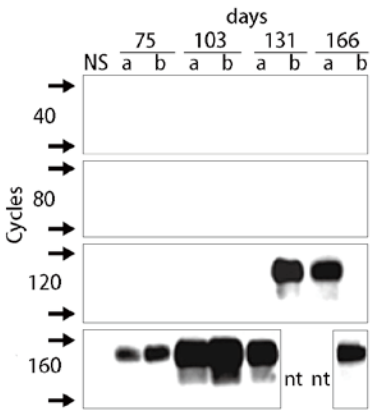
PMCA法では、検体と正常動物由来の脳乳剤を試験管内で混合・希釈した後、超音波処理を行いま

す。検体中にPrP<sup>Sc</sup>が含まれている場合、これがシードとなって脳乳剤中のPrP<sup>C</sup>はPrP<sup>Sc</sup>に構造変換されます。超音波処理行程を繰り返すことによってPrP<sup>Sc</sup>が蓄積し、検体中のPrP<sup>Sc</sup>が極微量であってもWBで検出可能となります。また、PMCA産物をさらに希釈し、新たに増幅を行えばさらに検出感度

をあげることができます。PMCAとは増幅原理は異なりますが、核酸の増幅におけるPCR法やnested-PCRをイメージすれば理解しやすいと思います。PMCA法が考案されて以来、増幅装置の共同開発を含めてプリオン病の早期診断法の開発に取り組み、ハムスターを用いたスクレイピー感染モデルでは血液や尿からPrP<sup>Sc</sup>が検出できることを明らかにしました。体液中のPrP<sup>Sc</sup>を検出するには、極めて高い検出感度が必要ですが、ハムスターでは増幅を繰り返せば、感染脳乳剤を10<sup>-12</sup>倍に希釈してもPrP<sup>Sc</sup>を検出できます。経口接種後のPrP<sup>Sc</sup>の体内動態を調べたところ、白血球分画では潜伏期(接種後75日、図)からもPrP<sup>Sc</sup>が検出でき、プリオン病の早期診断への応用が期待できます。

一方、PrP<sup>Sc</sup>の増幅様式は多様であり、各PrP<sup>Sc</sup>に適した増幅条件の確立が必要です。現在、BSEや羊スクレイピーの早期診断法としてPMCA法の有効性を検討している段階です。牛や羊でも超高感度検出が可能になり、感染性とPrP<sup>Sc</sup>の関連が明らかになれば、診断法のみならず、不活化処理の有効性評価法や肉骨粉など肥飼料原材料の安全性評価法等として、PMCA法は広範な畜産分野に応用できる技術となるでしょう。

掲載誌 J. Gen. Virol. 2007; 88: 2890-2898.



白血球分画におけるPrP<sup>Sc</sup>検出  
接種後75日~166日に各2匹のハムスター(a, b)から採材し、PMCA増幅後、WBでPrP<sup>Sc</sup>を検出した。  
NS:シードなしコントロール、  
nt:not tested.



(左から三島徳子、村山裕一、吉岡 都、今村守一、下寄紀子)