

氏 名 (国籍)	Kai-Uwe Dietrich Grathwohl (ドイツ連邦共和国)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第41号
学位授与年月日	平成9年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Improvement of Scrapie Diagnosis : Higher Sensitivity of PrP ^{Sc} -Detection by Western Blot Analysis and Establishment of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 品川 森 一 副査 岐阜大学 教授 平井 克 哉 副査 東京農工大学 教授 本多 英 一 副査 岩手大学 教授 品川 邦 汎 副査 帯広畜産大学 教授 白 幡 敏 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

スクレイピーに代表される伝達性海綿状脳症は (TSE) 長期の潜伏期の後に発症する中枢神経系の神経変性性の致死的な疾患である。その病原体は宿主の糖蛋白PrP (prion protein) の構造異性体PrP^{Sc}から構成されているため、宿主の免疫応答が無いという特徴がある。近年、TSEの摘発・予防は単に家畜疾病の制圧という面だけでなく、人へ感染の可能性を回避する上でも重要な課題となってきた。TSEには通常の感染症と違い血清診断が適用できず、主として、臨床症状と病理組織学的診断によって診断が行われているのが現状である。TSEの摘発・予防の実施には感染動物の適当な早期診断法の開発が重要である。この目的に適う診断法には長い潜伏期の内のできるだけ早期にバイオプシーによってTSE感染動物が高感度に摘発できることと、多検体を扱う屠畜場、検疫機関などの事業所での検査にも応用できる簡便で実用的なPrP^{Sc}検出法の開発が必要である。

TSE感染後、中枢神経系組織に先立って、細網リンパ系組織に徐々に蓄積するPrP^{Sc}をウエスタンブロット法により検出することにより、潜伏期の動物を摘発できることが指摘されている。しかし、実用化には感度の向上と、操作の簡便化が必要である。本研究は、以前に当研究室で確立された方法 (Doi et al., J. Gen. Virol., 69, 955-960,

1988) を基に、試料調製法の改良及びウエスタンブロット法よりも高感度でかつ多検体の検査が可能となる酵素免疫測定法 (ELISA) 法の開発を、マウスの実験モデルを用いて行った。

(第1章) PrP^{Sc}検出感度の向上を目的として、潜伏期早期におけるスクレイピー感染マウスの細網リンパ系組織として脾臓を対象として、PrP^{Sc}の回収効率よい試料調整法について検討し、ウエスタンブロット法によって判定した。このための組織処理法の検討はPrP^{Sc}の回収率を向上させるうえで重要であった。即ち、脾臓を2% Triton X-100/0.5% Sarkosyl とコラゲナーゼで処理により、従来行われている機械的な破碎のみによる均質化に比べ、PrP^{Sc}の検出感度が5倍程度高くなった。次に多容量の処理試料に対応するため、PrP^{Sc}の効果的な濃縮法について検討した。銅イオンを充填したキレートアフィニティービーズによる濃縮法と、従来用いている6.25% Sarkosyl による抽出と12% NaCl による塩析の組み合わせた調製法によるPrP^{Sc}の濃縮効果を比較した。その結果、潜伏期早期のPrP^{Sc}検出法としては後者の方が適していた。以上の結果を基にした、2% Triton X-100/0.5% Sarkosyl とコラゲナーゼ処理及びSarkosyl 抽出/NaCl 塩析によるPrP^{Sc}の濃縮法を組み合わせたPrP^{Sc}試料調整法 (TCSN法) と、従来の方法を比較した。TCSN法では感染後1週間で脾臓からPrP^{Sc}を検出できたが、後者では2週間目から検出された。以上のことから、TCSN法は従来の方法よりも高感度にPrP^{Sc}を検出できた。さらに、本法では従来の試料調整法より2~3倍量の組織を処理して検査が可能であり、低濃度しかPrP^{Sc}を含まぬスクレイピー感染早期の組織に対応できることから、早期診断に応用可能なことが示唆された。

(第2章) PrP^{Sc}検出にELISA法の応用を検討した。ELISA法では難溶性で凝集しやすいPrP^{Sc}を溶解して効率よく固相化することが必要であり、さらに試料調整の段階で非特異反応物質を除去することが要求される。

PrP^{Sc}のマイクロプレートへの固相化には、PrP^{Sc}を2~4Mのグアニジンチオシアン酸塩 (GdnSCN) に溶解することが有効であった。試料調整法は、脳を被験材料とした場合は、8% Zwittergent/0.5% Sarkosyl 存在下で均質化、コラゲナーゼ処理、proteinase K 処理を行うことにより非特異反応が除去できた。しかし、脾臓では、4% Triton X-100/0.5% Sarkosyl 存在下で均質化、酵素処理後の遠心沈殿物をSarkosyl 抽出/NaCl 塩析操作によりPrP^{Sc}を抽出する必要がある。検出感度の比較から、ELISAはウエスタンブロット法と同等以上であった。即ち、ELISAによるPrP^{Sc}検出法の基礎を確立することができた。

以上、本研究では、潜伏期早期にあるTSE感染動物摘発のための試料調整法の改良を行い、より早期にTSE感染動物を摘発可能にする試料調整法を確立した。またその知見を応用してELISAによるPrP^{Sc}検出法を確立した。本研究で確立した試料調整法は現行法よりも簡便であり、ELISA法は現行のウエスタンブロット法よりも感度が高く、しかも短時間で結果が得られることから、実用的なPrP^{Sc}検出法として応用可能であると考えられる。さらにこれらの方法の修正によりTSE汚染畜産物の摘発にも応用可能と考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

動物の伝達性海綿状脳症の代表として、古くからスクレイピーが知られている。スクレイピーは実験的に異種動物に伝達できる以外に、飼料として与えられたミンクでの発生が知られている。最近ではレンダリング産物の濃厚飼料を介して牛に伝達し、牛海綿状脳症として大発生をもたらし、さらに牛海綿状脳症の人への伝達の可能性が指摘され、深刻な社会問題ともなっている。

伝達性海綿状脳症の診断は、発症した後に可能な臨床診断、病理組織学的診断が主体として行われたきた。スクレイピーでは、病原体を構成する宿主の膜蛋白由来のスクレイピープリオン蛋白(PrP^{Sc})が感染後、中枢神経系に先立って細網リンパ系組織に徐々に蓄積することから、細網リンパ系組織を標的にして PrP^{Sc} を検出して、早期診断を行う試みがなされた。本論文はマウスモデルを用いて、従来ウエスタンブロット法による PrP^{Sc} 検出のための試料調整法の改良を行った。機械的に組織を分散させる従来方法では、 PrP^{Sc} の抽出効率が悪いことに着目して、コラゲナーゼの使用した組織処理法を開発した。この方法は同時に夾雑蛋白を減少させる効果もあった。 PrP^{Sc} の回収効率が飛躍的に高くなった。またポリアクリルアミドゲルから蛋白を膜に転写する行程にウエットブロットを適用し、膜への転写効率を高めた。その結果、検出感度が上昇して、以前は感染後4～5週からしか検出できなかった PrP^{Sc} が一週から検出可能となった。この一連の改良は海綿状脳症の診断以外に研究にも応用できて重要である。

さらに、多量の試料を検査する必要性に対応するため、ELISA法を用いた PrP^{Sc} の検出法を開発した。従来、ELISA法は精製された病原体あるいは PrP^{Sc} の一部の合成ペプチドによる抗体作成の際に用いられたことがあるだけであり、その理由として、ウエスタンブロット法では多少の非特異反応を示す夾雑蛋白が存在しても、パターンから正確に陽性あるいは陰性の判定が可能であるが、ELISA法では非特異反応の存在は許されないことにある。非特異反応を示さない試料は中枢神経系組織からは、比較的容易に調整できるが、細網リンパ系組織の代表として使用した脾臓からの試料調製法は困難であることが漠然とあるが一般に認識されていた。しかし、早期診断に応用するためには細網リンパ系組織からの試料調製法を確立することが必須である。本研究で、脳に比べると若干検出感度が低いものの試料調整に成功した。これは PrP^{Sc} の絶対量が少ないことに起因すると考えられる。また、 PrP^{Sc} は熱SDS以外では完全に可溶化できなが、プラスチックウエルへの吸着が阻害されるため、グアニジン塩によってこの点を解決したため、ELISAが PrP^{Sc} の検出に使用可能であることを示した。

本研究で開発された、ウエスタンブロット法およびELISA法のための試料調整法およびELISA法のための試料処理法は、この分野でのパイオニア的研究であり、海綿状脳症の制圧に、大いに貢献するものと期待される。

以上、学位論文審査委員会は、提出論文ならびに学位論文の基礎となる学術論文などについて慎重に審議した結果、審査委員全員一致をもって本提出論文が博士の学位論文として十分に価値があるものと判断した。