

9) BSE 診断のための高感度プリオン検査法

(高感度で簡便な異常プリオン蛋白質検出法)

北海道立畜産試験場 畜産工学部 遺伝子工学科、感染予防科、代謝生理科

1. 試験のねらい

牛海綿状脳症 (BSE) のスクリーニング検査には、現在エライザ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検出技術の開発が求められている。そこで、ウシ型プリオン蛋白質 (ウシ PrP) に対する単クローン抗体を作製し、ルシフェラーゼの生物発光法 (図 1) を原理とする異常プリオン蛋白質の検出法を開発する。

2. 試験の方法

1) 抗ウシ型プリオン蛋白質単クローン抗体の作製

2) 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

3) BSE 感染脳組織を用いた市販 BSE 検査用エライザキットとの比較

3. 試験の結果

1) 大腸菌による蛋白質発現によりウシ型組み換えプリオン蛋白質を作製し、反応性の高い捕捉用抗体 (6b) と検出用抗体 (2b) の組合せを見出し、ウシ PrP 測定用抗体とした。

2) 磁性粒子を用いた生物発光法 (本法) 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は、プロテイナーゼ K によって分解されないプリオン蛋白質の検出が可能であった (図 2)。

3) プロテイナーゼ K 処理後の BSE 感染脳乳剤を感作させた磁性粒子の PrP 検索をウエスタンブロット法で行ったところ、約 27kd に PrP を検出した。

4) 本法は、市販の BSE 検査用エライザキットよりも、すべての希釈倍率で感度が上回り (図 3) 検査に必要な時間は約 2 時間 45 分であり、エライザキットの約 2/3 と短くなった (表 1)。

これらのことから、本法は、BSE 感染脳組織から微量の異常プリオン蛋白質を検出することができ、市販の BSE 検査用エライザ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。

用語解説

ルシフェラーゼによる生物発光・・・ホタルは、体内で生産する酵素「ルシフェラーゼ」が触媒となり、体内の「ルシフェリン」と高エネルギー化合物「アデノシン 3 リン酸」(ATP) と反応して光る。このホタルの光る原理が微量物質測定に利用されている。

エライザ法・・・エライザ法は、抗原抗体反応を用いて蛋白質を測定する極めて特異性の高い方法である。プリオンの有無を抗体に付いた酵素により色の変化として検出し、発色の度合いにより判定する方法が、BSE のスクリーニング検査 (一次検査) に用いられている。

ウエスタンブロット法・・・ゲル電気泳動により分子量にしたがって分離した蛋白質を転写膜に写し取り、さらに転写膜上で抗原抗体反応によって特定の蛋白質を発色させてその存在を肉眼で観察する方法である。発色反応に加えて分子量がわかることからエライザ法よりも特異性が高い方法であり、BSE 検査では、二次検査に用いられている。

磁性粒子・・・酸化鉄を含んだ直径数ミクロンのポリエチレン球形型粒子であり、表面にプリオン蛋白質に対する抗体をコーティングすることによって、目的のプリオン蛋白質のみを付着させ、永久磁石を用いてこの抗原抗体反応物質を混合溶液中から分離できる。

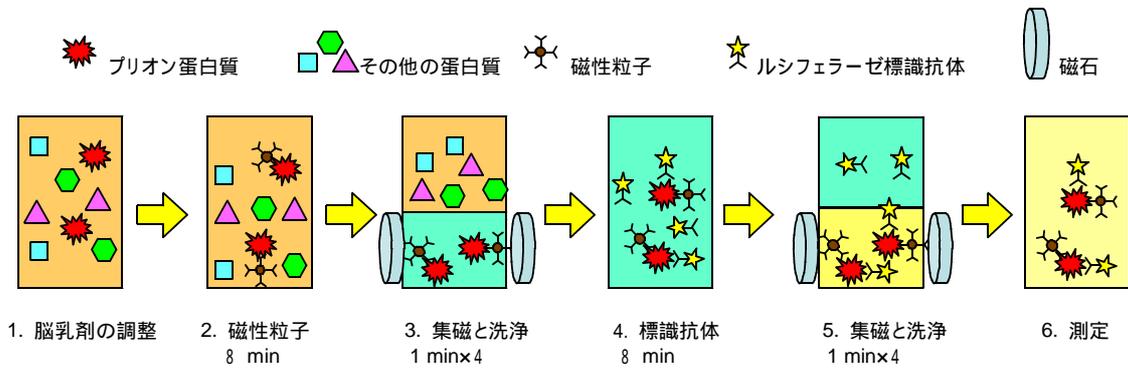
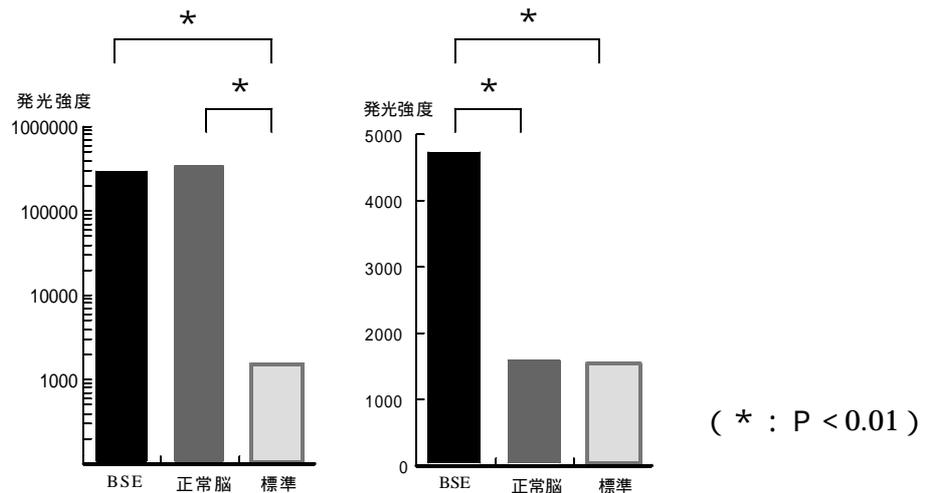


図1 磁性粒子を用いた生物発光法の原理と手順



プロテイナーゼK処理前 プロテイナーゼK処理後

図2 BSE感染脳からのプロテイナーゼKに分解されないプリオン蛋白質の検出

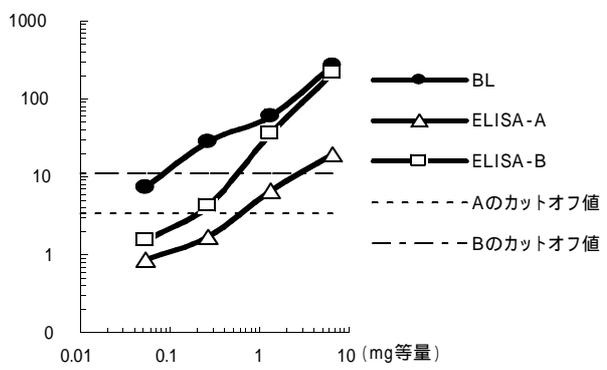


図3 感染脳を用いた検出感度の比較

BL : 磁性粒子を用いた生物発光法、 ELISA : エライザ法

表1 磁性粒子を用いた生物発光法と他の主なBSE検査法の検出所要時間

	磁性粒子を用いた 生物発光法	エライザキット A	エライザキット B	ウエスタンブロット法
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
所要時間	約 2 時間 45 分	約 4 時間 30 分	約 4 時間	約 8 時間