

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/145194

発行日 平成23年10月13日 (2011.10.13)

(43) 国際公開日 平成21年12月3日 (2009.12.3)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
 C O 7 K 14/47 (2006.01) C O 7 K 14/47 4 H O 4 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

出願番号	特願2010-514497 (P2010-514497)	(71) 出願人	501203344 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/059617		
(22) 国際出願日	平成21年5月26日 (2009.5.26)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-139280 (P2008-139280)	(74) 代理人	100083301 弁理士 草間 攻
(32) 優先日	平成20年5月28日 (2008.5.28)	(72) 発明者	村山 裕一 茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	舩基 賢太郎 茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内

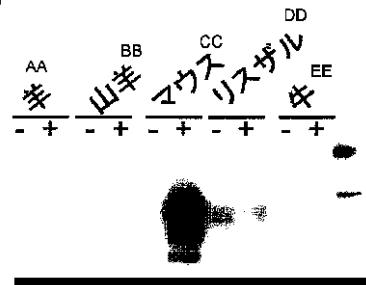
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 羊スクレイピー由来異常プリオン蛋白質の効率的増幅方法

(57) 【要約】

羊スクレイピー由来の異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S</sup><sup>c</sup>) の効率的な増幅方法を提供することを一義的な課題とし、究極的には、スクレイピーに感染した羊の早期発見によるプリオン病の伝播を根絶すること、また、プリオン不活性化方法の開発及びその早期評価を可能にすることであり、正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) をソースとし、異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S</sup><sup>c</sup>) をシードとして用い、両者を混合・培養 - 超音波処理を繰り返すことによる羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup><sup>c</sup>を増幅させるP M C A (protein misfolding cyclic amplification) 法において、PrP<sup>C</sup>として、異種動物のPrP<sup>C</sup>を使用することを特徴とする羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup><sup>c</sup>の効率的増幅方法である。

【図1】



-: シード無添加コントロール(PrPCのみ) FF  
 +: スクレイピー感染羊脳乳剤添加 GG

AA... SHEEP  
 BB... GOAT  
 CC... MOUSE  
 DD... SQUIREL MONKEY  
 EE... BOVINE  
 FF... CONTROL WITHOUT ADDITION OF SEED (ONLY PrPC)  
 GG... WITH ADDITION OF BRAIN HOMOGENATE OF SCRAPIE-INFECTED SHEEP

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) をソースとし、異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>) をシードとして用い、両者を混合・培養・超音波処理を繰り返すことによる羊スクレイピー由来 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> を増幅させる蛋白質ミスホールディング循環増幅 (PMCA: protein misfolding cyclic amplification) 法において、PrP<sup>C</sup> として、異種動物の PrP<sup>C</sup> を使用することを特徴とする羊スクレイピー由来 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の効率的増幅方法。

## 【請求項 2】

ソースとして用いる異種動物の PrP<sup>C</sup> が、齧歯類の PrP<sup>C</sup> である請求項 1 に記載の羊スクレイピー由来 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の効率的増幅方法。

10

## 【請求項 3】

異種動物である齧歯類が、マウス又はラットである請求項 2 に記載の羊スクレイピー由来 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の効率的増幅方法。

## 【請求項 4】

ソースとして用いる PrP<sup>C</sup> が、PrP<sup>C</sup> を含む脳乳剤であり、シードとして用いる羊スクレイピー由来の PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> が、羊スクレイピー感染動物由来の PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> を含む体組織である請求項 1 に記載の羊スクレイピー由来 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の効率的増幅方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、羊スクレイピー由来の異常プリオン蛋白質の効率的な試験管内の増幅方法に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

異常プリオン蛋白質の増殖による疾患として最初に発見されたのが、スクレイピー (Scrapie) という羊にみられる運動機能失調にかかわる疾患であり、脳にスポンジ状の空胞形成が認められるという特徴をもつ。その後、この異常プリオン蛋白質の増殖による疾患として、狂牛病とも称されている牛海綿状脳症 (BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy)、ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD: Creutzfeldt Jakob Disease) や、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (GSS: Gerstmann-Strausser-Scheinker Syndrome) などが知られている。

30

## 【0003】

これらの疾患はウイルス感染によるものではなく、また既知の病原体は発見されておらず、特異的な蛋白質が共通に存在するところから、これが伝達～感染を引き起こす病原物質と思われ、「蛋白質性感染粒子“プリオン” : proteinaceous infectious particle : prion」が提唱されて、上記した各種の特異的疾患は、プリオン病と称されるようになった。

## 【0004】

ところで、ヒトのプリオン蛋白質遺伝子は、第 20 番染色体上に存在し、プリオン蛋白質は、235 個のアミノ酸により構成されていることが判明している。感染因子プリオンの主な構成成分はこのプリオン蛋白質と考えられており、感染因子を構成するプリオン蛋白質をスクレイピー型または異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>) と称し、正常型のプリオン蛋白質を正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) と称している。

40

ヒトを含む多くの動物種でプリオン病が認知され、一般的にプロテアーゼ抵抗性の異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>) の蓄積が感染個体に認められることから、この PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> が主病原体として関与していると考えられている。

## 【0005】

プリオン病の伝播は、異種の動物間でも起こりえる。例えば、スクレイピーに感染した羊材料の動物飼料への混入により牛に感染して BSE を発症した可能性があり、さらに BSE に感染した牛材料を含む飼料を食した猫に、猫海綿状脳症 (FSE) が発症したと考

50

えられる。したがって、最近の研究では、特に B S E がヒトへ感染する可能性が濃厚となっていると報告されている（非特許文献 1）。

【0006】

スクレイピーは、羊、山羊にみられるプリオン病であるが、18世紀にヨーロッパにおいて大流行し、我が国でも1948年以降、散発的であるが発生が認められている。

ところで、スクレイピー感染羊、すなわち、異常プリオン蛋白質（PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>）に感染した羊には、他の感染症や代謝病の診断に用いられているような簡便な診断法が応用できず、また潜伏期間が長いことから、スクレイピー感染羊の実用的な生前診断法は確立されていない。さらに、血液などの生体材料に含まれる PrP<sup>S<sup>c</sup></sup> 量は極微量であると考えられ、生前診断には、従来法の検出限界をはるかに凌ぐ超高感度な検出技法の開発が必要である。

10

【0007】

一方、異常プリオン蛋白質（PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>）は、通常の滅菌処理では不活性化されないという特徴を有している。PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の不活性化の確認には、通常、不活性化されたであろう PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>をマウスなどの実験動物に接種し、発症の有無を確認することで感染性を検出するバイオアッセイ法が用いられる。しかしながら、この方法は実験動物を長期間飼育・観察する必要があり、その結果は数十～数百日後でないと得られず、膨大な経過観察の手間と費用がかかるという問題がある。

したがって、不活性化処理後、残存する PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を短期間に検出することができる高感度な方法が開発できれば、プリオン不活性化方法の開発、及びその評価において著しい改善をもたらすことになる。

20

【0008】

これまで行われている異常プリオン蛋白質（PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>）の検出方法としては、プリオンに感染した脳乳剤と正常脳乳剤を試験管内で混合し、超音波処理・攪拌培養を繰り返すことによって PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を増幅させる方法としての PMCA（蛋白質ミスホールディング循環増幅：protein misfolding cyclic amplification）法が開発され、極微量の PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を検出することが可能となった（非特許文献 2、特許文献 1）。

【0009】

この PMCA 法で用いられた PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>は、スクレイピー（ハムスターに順化させた 263K 株）を感染させたハムスターの脳乳剤であり、これを希釈し、それに正常プリオン蛋白質（PrP<sup>C</sup>）として正常なハムスターの脳乳剤を加えて、混合し、試験管内で培養させ、過剰に加えられた PrP<sup>C</sup>が PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に構造変換されることにより PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を増幅させ、これを超音波処理にかけて、凝集している PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を微細化し、再び過剰の PrP<sup>C</sup>と培養するという、一連の混合・培養 - 超音波処理のサイクルを繰り返すことにより PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の量を増幅させる方法である。

30

【0010】

この PMCA 法は、ハムスタースクレイピー感染モデルの PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の増幅には極めて有効なものであり、5 サイクルで PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の増幅率は平均 58 であり、10 サイクルでは、PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>サンプルを 1 万倍以上に希釈しても検出でき、感染ハムスターの血液（非特許文献 3）や尿（非特許文献 4）といった体液中の極微量の PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を検出することが可能であり、潜伏期にある動物の血液細胞からも PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を検出することができ（非特許文献 5 および 4）、プリオン病の早期診断法、或いはプリオン不活性化の評価法としての有用性が示されている。

40

【0011】

しかしながら、提案された PMCA 法は、ハムスタースクレイピー感染モデルの PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の増幅には極めて有効なものであるが、スクレイピー感染羊の異常プリオン蛋白質（PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>）の増幅に適用すると、十分な増幅が得られないといった問題があり、羊スクレイピーの生前診断法若しくは早期診断法としてはその応用は十分なものではない。

【特許文献 1】特公表 2004 - 503748 号公報

【非特許文献 1】Nature, 383: p685-690 (1996)

50

【非特許文献2】Nature, 411: p810-813 (2001)

【非特許文献3】Nat. Med., 11: p982-985 (2005)

【非特許文献4】J. Gen. Virol., 88: p2890-2898 (2007)

【非特許文献5】Science, 313: p92-94 (2006)

【非特許文献6】FEBS Lett., 579: p638-642 (2005)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって本発明は、かかる現状に鑑み、羊スクレイピー由来の異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S</sup>C) の効率的な増幅方法を提供することを一義的な課題とし、究極的には、スクレイピーに感染した羊の早期発見によるプリオン病の伝播を根絶すること、また、プリオン不活性化方法の開発及びその早期評価を可能にすることを課題とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

かかる課題を解決するために、本発明者はこれまで行われているPMCA法を改良することにより、羊スクレイピー由来の異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S</sup>C) を効率に増幅させることが可能となり、本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、これまで提案されているハムスタースクレイピー感染モデルのPrP<sup>S</sup>Cの増幅を可能にするPMCA法においては、増幅するPrP<sup>S</sup>Cと同種の正常動物 (ハムスター) のPrP<sup>C</sup>を混合して、PrP<sup>S</sup>Cを増幅させている。

20

これは一般的に、異種動物間で増幅を行うと、同種動物間に比較して増幅効率が低い、或いは全く増幅できないからである (非特許文献6)。

本発明者はこの点を改良するべく検討を加え、羊スクレイピー由来のPrP<sup>S</sup>Cの増幅を行うに当たって、異種動物の正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) をソースとして使用した結果、驚くべきことに、PrP<sup>S</sup>Cの増幅効率が大幅に改善され、従来PMCA法では検出できなかった極微量の羊スクレイピー由来のPrP<sup>S</sup>Cをも検出することが可能となることを確認し、本発明を完成させるに至った。

【0015】

而して本発明は、正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) をソースとし、異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S</sup>C) をシードとして用い、両者を混合・培養・超音波処理を繰り返すことによる羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup>Cを増幅させる蛋白質ミスホールディング循環増幅 (PMCA: protein misfolding cyclic amplification) 法において、PrP<sup>C</sup>として、異種動物のPrP<sup>C</sup>を使用することを特徴とする羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup>Cの効率的増幅方法である。

30

【0016】

具体的には、本発明は、ソースとして用いる異種動物のPrP<sup>C</sup>が、齧歯類のPrP<sup>C</sup>である上記の羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup>Cの効率的増幅方法である。

【0017】

より具体的には、本発明は、異種動物である齧歯類として、マウス又はラットを用いる上記の羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup>Cの効率的増幅方法である。

40

【0018】

更に具体的には、本発明は、ソースとして用いるPrP<sup>C</sup>が、PrP<sup>C</sup>を含む脳乳剤であり、シードとして用いる羊スクレイピー由来のPrP<sup>S</sup>Cが、羊スクレイピー感染動物由来のPrP<sup>S</sup>Cを含む体組織である上記の羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup>Cの効率的増幅方法である。

【発明の効果】

【0019】

本発明方法により、羊スクレイピー由来のPrP<sup>S</sup>Cについて、極微量のPrP<sup>S</sup>Cを検出することが可能となり、本発明方法による羊スクレイピー由来のPrP<sup>S</sup>Cの検出感

50

度は、E L I S A法などの既存の検出方法と比較して著しく効率的なものであり、増幅反応を適宜繰り返すことにより、バイオアッセイ法を上回る感度が得られる利点を有している。

さらに、従来のバイオアッセイ法によるPrP<sup>S</sup>Cの検出には膨大な時間と経費がかかっていたが、これを回避することが可能となり、その実用性、迅速性の面においても優れたものである。

#### 【0020】

したがって、羊スクレイピーの生前診断並びに早期診断を可能にし、その上、羊スクレイピー異常プリオン蛋白質の不活性化の迅速な評価が可能となることから、異常プリオン蛋白質の不活性化方法を確立する一助となる。また、肉骨粉などの飼肥料原材料の安全性評価法、土壌PrP<sup>S</sup>C等の環境モニタリング等に応用できる利点を有している。

特に、羊スクレイピーの発生は、日本のみならず、オーストラリアとニュージーランドを除く多くの羊飼育国で確認されており、また、未発生国においても今後の発生のリスクは考慮されるべきであるが、本発明方法は生体（動物）輸入に対する防疫対策、更には輸入羊肉に対する羊スクレイピーの予防対策としても有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0021】

【図1】本発明の試験例1に従う、各異種動物PrP<sup>C</sup>ソースを添加した結果を示した図である。

【図2】本発明の試験例1に従う、各異種動物PrP<sup>C</sup>ソースを添加した結果を示した図である。

【図3】本発明の試験例2に従う、シードとしてのPrP<sup>S</sup>Cの添加濃度を検討した結果を示した図である。

【図4】本発明の試験例2に従う、シードとしてのPrP<sup>S</sup>Cの添加濃度を検討した結果を示した図である。

【図5】本発明の試験例3に従う、シードとしてのPrP<sup>S</sup>Cの添加濃度を検討した結果を示した図である。

【図6】本発明の試験例4に従う、遺伝子型の異なるスクレイピー感染羊由来のPrP<sup>S</sup>Cについて、その増幅を検討した結果を示した図である。

【図7】本発明の試験例4に従う、遺伝子型の異なるスクレイピー感染羊由来のPrP<sup>S</sup>Cについて、その増幅を検討した結果を示した図である。

【図8】本発明の試験例5に従う、スクレイピー感染羊における血中PrP<sup>S</sup>Cの検出の結果を示した図である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0022】

本発明は、上記したように、その基本的な態様は、正常プリオン蛋白質（PrP<sup>C</sup>）をソースとし、異常プリオン蛋白質（PrP<sup>S</sup>C）をシードとして用い、両者を攪拌混合・培養・超音波処理を繰り返すことによる羊スクレイピー由来のPrP<sup>S</sup>Cを増幅させるPMCA法において、PrP<sup>C</sup>として、異種動物のPrP<sup>C</sup>を使用することを特徴とする羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup>Cの増幅効率的増幅方法である。

##### 【0023】

ここで使用するソースとしての正常プリオン蛋白質（PrP<sup>C</sup>）は、スクレイピー感染羊のPrP<sup>S</sup>Cの増幅を図ることから、羊以外の異種動物のPrP<sup>C</sup>であり、そのような異種動物のPrP<sup>C</sup>として種々のものを挙げることができるが、具体的には、マウス、ラットなど齧歯類から選択されるPrP<sup>C</sup>を挙げることができる。

そのなかでも、特にマウスのPrP<sup>C</sup>をソースとして用いることにより、PrP<sup>S</sup>Cの増幅効率を高めることができる。

なお、異種動物であっても、山羊、牛、ブタ、ハムスター、ニワトリ、リスザル、カニクイザルのPrP<sup>C</sup>をソースとして用いても、PrP<sup>S</sup>Cの増幅は認められなかった（後記する試験例を参照）。

10

20

30

40

50

## 【0024】

ソースとして用いる正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) としては、これらの異種動物の体組織を用いることができ、好ましくは脳乳剤が使用される。

この脳乳剤は、これら異種動物の脳を乳鉢等によりすりつぶしたもの (ホモジネートしたもの) であるが、より具体的には、正常異種動物の脳を、1% Triton X-100 (t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール) - 4mM EDTA - PBS (プロテアーゼインヒビターを含む) でホモジナイズし、10% (w/v) 溶液としたものを用いるのがよい。

## 【0025】

一方、シードとして用いる羊スクレイピー由来の PrP<sup>S</sup> としては、スクレイピー感染羊の体組織が好ましく使用される。そのような体組織としては、スクレイピー感染羊の脳組織、血液組織、尿等、あらゆる体組織を使用することができる。

すなわち、本発明が提供する増幅方法よれば、極微量の PrP<sup>S</sup> であっても効率的に PrP<sup>S</sup> を増幅することが可能となる。したがって、この新たな PMCA 法を活用することにより、極微量の羊スクレイピー由来の異常プリオン蛋白質が存在する試料の検出が可能となり、スクレイピー感染羊検出感度が高まるものであることから、シードとして用いる羊スクレイピー由来の PrP<sup>S</sup> としては特に限定されず、スクレイピー感染羊のあらゆる体組織を使用することが可能である。

## 【0026】

ところで従来 of ハムスタースクレイピー感染モデルの PrP<sup>S</sup> を増幅させる PMCA 法にあっては、増幅を行う場合にあって、通常、界面活性剤を添加し異常プリオン蛋白質を可溶化した後に PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>S</sup> を混合し、ソースとして用いた PrP<sup>C</sup> を PrP<sup>S</sup> に構造変換させ、増幅を図っている。

本発明の PMCA 法においても界面活性剤の存在下に行われ、そのような界面活性剤としては、非イオン性の界面活性剤であり、好ましくは、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (Triton X-100)、ポリオキシエチレン (9) オクチルフェニルエーテル (NP-40) 等が使用されるが、これに限定されるものではない。

## 【0027】

本発明方法の一般的な操作方法を、以下に説明する。

すなわち、本発明方法にあっては、上記したように、異種動物の正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) をソースとし、羊スクレイピー由来の PrP<sup>S</sup> をシードとして用い、両者を攪拌混合・培養するが、その培養 (インキュベーション) 条件は一概に限定されるものではなく、適宜最適な培養条件を選択することができる。具体的には、例えば、37℃ で攪拌しながら 1 時間程度 インキュベートする方法で行うことができる。

## 【0028】

この攪拌混合・培養により、ソースとして加えられた異種動物の PrP<sup>C</sup> の一部が PrP<sup>S</sup> に構造変換されるが、その構造変換された PrP<sup>S</sup> の凝集体を超音波処理により分散させ、再度過剰に存在する PrP<sup>C</sup> と攪拌混合・培養させるサイクルを繰り返す。

この超音波処理は、通常 of PMCA 法で用いられている超音波処理をそのまま適用することができるが特に限定されず、例えば、Branson 社の Digital Sonifier 450D、或いはエレコン社 070-GOT を用いて行うことができる。

なお、超音波処理条件としては、用いる装置により一概に限定できないが、例えば、出力を 100% に設定し、0.2 秒発振 - 0.1 秒停止、或いは 3 秒発振 - 1 秒休止のサイクルを 5 回程度行うのがよい。

## 【0029】

この攪拌混合・培養 - 超音波処理のサイクルを繰り返すことにより、ソースとして添加した PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>S</sup> に順次構造変換され、その結果、PrP<sup>S</sup> の増幅が行われることとなる。

本発明方法にあっては、通常上記のサイクルを用い、20 ~ 40 サイクルを 1 回の増幅反応として実施するのがよい。

10

20

30

40

50

なお、このサイクル回数は、使用するソースとして用いる PrP<sup>C</sup>、並びにシードとして用いる PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の濃度によって異なり、限定されるものではない。

【0030】

PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の増幅（攪拌培養 - 超音波処理のサイクルの繰り返し）が完了した後、得られた反応物を、蛋白分解酵素を用いて分解処理する、分解処理工程に付す。

一般に、異常プリオン蛋白質はプロテアーゼに抵抗性を示すので、特異的にこの蛋白質を取り出すためには、正常プリオン蛋白質を分解することが要求される。したがって、この分解処理工程は、プリオン蛋白質以外の蛋白質を分解すると共に、正常プリオン蛋白質を分解する工程である。

蛋白質分解酵素としては、プロティナーゼ K (Proteinase K) を挙げることができ、これを用いて分解することが望ましい。

10

【0031】

なお、増幅された PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の検出は、ウエスタンブロッティング法で検出することができる。具体的には、15% SDS - PAGE で分離・泳動後メンブランに転写し、ブロッキング後、HRP 標識抗 T2 抗体で反応させる。次いで、メンブランを洗浄後、Immobilon Western で発光反応を検出し、増幅された PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> を検出・確認することができる。

【0032】

本発明者の検討によれば、1回の増幅（攪拌培養 - 超音波処理の40サイクル）反応を5回繰り返すことで、スクレイピー感染羊脳乳剤を  $10^{-10}$  に希釈しても検出できることが判明した。

20

したがって、本発明方法は、実用性、迅速性において極めて優れたものであり、羊スクレイピーの診断法、安全性評価法、防疫法として使用される可能性が高く、その応用性は多大なものである。

【0033】

ところで、羊 PrP 遺伝子には、種々のアミノ酸置換をもたらす変異が存在することが知られている。したがって、最近では羊スクレイピー抵抗性の固体を高める方向で、育成羊の選定と交配が行われつつある。

本発明者の検討によれば、遺伝子型の異なる羊に由来する PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> であっても、本発明方法により、効率的に PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の増幅が行えることが判明した（後記する試験例を参照）。

30

【実施例】

【0034】

以下に本発明を、実施例に代わる試験例により、より詳細に説明していくが、本発明はこれらの試験例により何ら限定されるものではない。

【0035】

試験例 1：羊スクレイピー由来 PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> の増幅（ソースの検討）

1. 方法

PMCA (protein misfolding cyclic amplification) 法を用いて、羊スクレイピー由来の異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>) を増幅した。

40

正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) ソースは、同種動物として正常羊、異種動物として山羊、マウス、リスザル、牛、ブタ、ニワトリ、ハムスター、ラット及びカニクイザルの 10% 脳乳剤を用いた。

一方、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup> シードは、英国由来のスクレイピー感染羊 10% 脳乳剤を  $10^{-1}$  に希釈して用いた。

PMCA 増幅後、サンプルをプロティナーゼ K で消化し、ウエスタンブロッティング法でプロテアーゼ抵抗性 PrP (PrP<sup>R<sup>E</sup>S</sup>) のシグナルを検出した。

【0036】

2. 結果

その結果を図 1 及び図 2 に示した。図 1 には PrP<sup>C</sup> のソースとして羊、山羊、マウス

50

、リスザル及び牛の結果を、また図2にはブタ、ニワトリ、ハムスター、ラット及びカニクイザルの結果を示した。

これらの結果から判明するように、ソースとして用いるPrP<sup>C</sup>にあつては、同種動物(羊)のPrP<sup>C</sup>では殆ど増幅が認められないのに対して、異種動物のマウスのPrP<sup>C</sup>を使用した場合には、効果的なPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅が認められた。

なお、異種動物のラットのPrP<sup>C</sup>を使用した場合には、シード無添加コントロールに比べて強いシグナルが認められ、マウスに比べると効率は低いものの、増幅が認められた。一方、山羊、牛、ニワトリ、ハムスターのPrP<sup>C</sup>をソースとして用いた場合、全くシグナルが認められず、リスザル、ブタ、カニクイザルのPrP<sup>C</sup>を使用した場合、シード無添加コントロールのシグナル強度が、感染羊脳乳剤を添加して増幅したサンプルのシグナル強度よりも強く、これら異種動物のPrP<sup>C</sup>を使用した場合、特異的なPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅は認められなかった。

【0037】

#### 試験例2：羊スクレイピー由来PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅(感受性の検討の1)

試験例1の結果から、ソースとして異種動物の中でもマウスPrP<sup>C</sup>を使用した場合には、PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅が極めて効果的なものであることが判明した。そこで、シードとして用いる羊スクレイピーのPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の濃度と増幅反応の回数が、どの様にPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅に影響を与えるものであるかを検討した。

【0038】

[その1]

1. 方法

試験例1と同様に、PMCA法を用いて、スクレイピー感染羊由来のPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>を増幅した。

PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>として、スクレイピー感染羊の脳乳剤を $10^{-1} \sim 10^{-3}$ に希釈して使用した。

ソースとしてのPrP<sup>C</sup>は、異種動物のICR系マウスPrP<sup>C</sup>を使用し、比較対照として同種動物の羊PrP<sup>C</sup>を用いた。

なお、無添加コントロールとして、シード無添加の対照をおいた。

【0039】

2. 結果

図3にその結果を示した。図中に示した結果からも判明するように、スクレイピー感染羊の脳乳剤は、 $10^{-3}$ に希釈した場合であっても、40サイクル/1回の増幅反応を2回行うことで効果的にPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅が認められた。

これに対して、同種動物である羊のPrP<sup>C</sup>をソースとした場合には、2回の増幅反応でも殆ど増幅が認められないものであった。

【0040】

[その2]

1. 方法

上記の1と同様に、PMCA法を用いて、スクレイピー感染羊由来のPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>を増幅した。

PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>として、スクレイピー感染羊の10%脳乳剤を $10^{-1} \sim 10^{-8}$ に希釈して使用した。

ソースとしてのPrP<sup>C</sup>は、異種動物のICR系マウスPrP<sup>C</sup>を使用し、無添加コントロールとして、シード無添加の対照をおいた。

【0041】

2. 結果

図4にその結果を示した。図中に示した結果からも判明するように、スクレイピー感染羊の脳乳剤は、 $10^{-8}$ に希釈した場合であっても、増幅反応を4回繰り返せば、PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の増幅が良好に行えるものであることが判明し、本発明の特殊性がよく理解される。

【0042】

10

20

30

40

50



試験例 3：羊スクレイピー由来 PrP<sup>S</sup>C の増幅（感受性の検討の 2）

上記した試験例 2 で、マウス PrP<sup>C</sup> をソースとして使用し、スクレイピー感染羊の脳乳剤を PrP<sup>S</sup>C として使用した場合には、脳乳剤をかなり希釈した場合であっても、増幅反応を繰り返すことにより PrP<sup>S</sup>C の効率的な増幅が認められた。

そこで、更に希釈した場合における PrP<sup>S</sup>C の増幅を検討した。

## 【0043】

## 1. 方法

試験例 2 のその 2 と同様にして、スクレイピー感染羊の 10% 脳乳剤を  $10^{-2} \sim 10^{-14}$  までに希釈して使用した。

ソースとしての PrP<sup>C</sup> は、異種動物の ICR 系マウス PrP<sup>C</sup> を使用し、無添加コントロールとして、ソース無添加の対照をおいた。増幅は duplicate で行った。

10

## 【0044】

図 5 にその結果を示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明方法により、極微量の PrP<sup>S</sup>C であっても、増幅反応を 5 回繰り返すことにより、 $10^{-10}$  に希釈した感染脳乳剤からも PrP<sup>S</sup>C の増幅が認められることが理解される。6～7 回の増幅によるハムスター PrP<sup>S</sup>C の検出限界は  $10^{-12}$  程度である。ウェスタンブロット解析により、感染羊脳乳剤に存在する PrP<sup>S</sup>C 量は、実験感染ハムスター脳乳剤に含まれる PrP<sup>S</sup>C 量の  $1/100 \sim 1/1000$  程度と推定され、その点を考慮するとハムスター PrP<sup>S</sup>C の検出限界と同程度の検出感度が本法により得られたことになる。

20

## 【0045】

試験例 4：羊スクレイピー由来 PrP<sup>S</sup>C の増幅（遺伝子型の異なる PrP<sup>S</sup>C の増幅）

羊 PrP 遺伝子には、種々のアミノ酸置換をもたらす変異が存在することが知られている。特に 136 番目 (A, V)、154 番目 (R, H) および 171 番目 (R, Q, H) の 3 箇所のアミノ酸の組み合わせはスクレイピーに対する感受性もしくは抵抗性と関連している。そこで、遺伝子型の異なるスクレイピー感染羊由来の PrP<sup>S</sup>C について、その増幅を検討した。

## 【0046】

## 1. 方法

使用した遺伝子の異なるスクレイピー感染羊として、英国由来の ARQ ホモ、V/ARQ ヘテロ、AR/HQ ヘテロ、AHQ ホモ羊の 4 種類を用いた。

30

それぞれの脳乳剤をマウス正常脳乳剤で  $1/1$ 、 $1/5$ 、 $1/25$  及び  $1/125$  に希釈し、増幅を行った。

## 【0047】

## 2. 結果

図 6 及び図 7 にその結果を示した。

図中に示した結果からも判明するように、検討した 4 種の遺伝子型異なる羊に由来する PrP<sup>S</sup>C であっても、本発明方法により増幅が可能であることが判明した。V/ARQ ヘテロ以外では 1 回の増幅でシグナルが認められたが、V/ARQ 型ではシグナルの確認に 3 回の増幅を要した。各遺伝子型の脳乳剤中の PrP<sup>S</sup>C 量は不明であり、V/ARQ 型の脳乳剤中の PrP<sup>S</sup>C 量が他に比べて少なかったか、V/ARQ 型の PrP<sup>S</sup>C の増幅効率が他に比べて低い可能性が考えられた。

40

## 【0048】

試験例 5：スクレイピー感染羊における血中 PrP<sup>S</sup>C の検出

本発明により、極微量の羊スクレイピー由来 PrP<sup>S</sup>C でも検出でき、感染羊における PrP<sup>S</sup>C の体内動態を、従来よりも詳細に解析することが可能になった。

そこで、スクレイピー実験感染羊を用いて、血液からの PrP<sup>S</sup>C 増幅について解析した。

## 【0049】

## 1. 方法

上記の試験例 1 と同様にして、PMCA 法を用いて、スクレイピー実験感染羊由来の P

50

r P<sup>S</sup> C を増幅した。発症期にある感染羊 2 頭から採血を行い、遠心分離して白血球分画を得た。2 %サルコシルを含むリン酸緩衝液中で、白血球分画を可溶化し、P r P<sup>S</sup> C シードとして用いた。ソースとしての P r P<sup>C</sup> は、異種動物の I R C 系マウスの P r P<sup>C</sup> を使用し、無添加コントロールとして、シード無添加の対照をおいた。

【 0 0 5 0 】

## 2 . 結果

図 8 にその結果を示した。

感染羊 # 2 の白血球分画からは、4 回目の増幅で P r P<sup>R E S</sup> シグナルが明瞭に確認された。感染羊 # 1 の白血球分画からは 5 回目の増幅で P r P<sup>R E S</sup> シグナルが明瞭になった。

10

なお、図中、N はシードを含まない無添加コントロールを示し、n t は、試験をしなかったことを示す。

本試験例の結果から、本発明による羊スクレイピー由来 P r P<sup>S</sup> C 増幅法は、血液サンプルにおいても有効であることが判明し、スクレイピーの生前診断に応用可能であることが理解される。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 5 1 】

以上説明してきたように、本発明が提供する方法により、羊スクレイピー由来の P r P<sup>S</sup> C について、効果的にその増幅を行うことができ、極微量の P r P<sup>S</sup> C を検出することが可能となった。

20

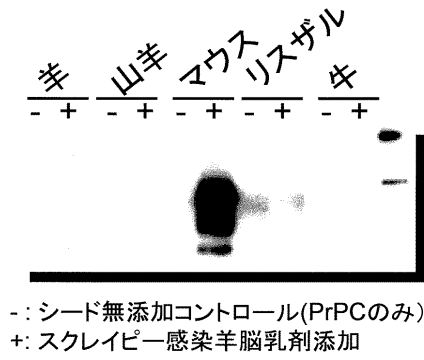
本発明方法による羊スクレイピー由来の P r P<sup>S</sup> C の検出感度は、E L I S A 法などの既存の検出方法と比較して著しく効率的なものであり、増幅反応の繰り返しによりバイオアッセイ法を上回る感度が得られるであろう利点を有しており、その実用性、迅速性の面においても優れたものである。

【 0 0 5 2 】

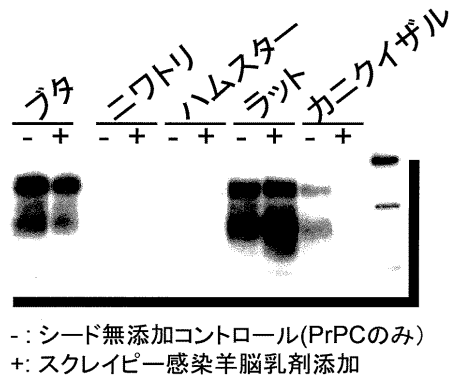
したがって、羊スクレイピーの生前診断、早期診断を可能にし、その上、羊スクレイピー異常プリオン蛋白質の不活性化の迅速な評価が可能となることから、異常プリオン蛋白質の不活性化方法を確立する一助となる。また、肉骨粉などの飼肥料原材料の安全性評価法、土壌 P r P<sup>S</sup> C 等の環境モニタリング等、更には、生体（動物）輸入に対する羊スクレイピー防疫対策、更には輸入羊肉に対する予防対策に応用でき、その有用性は極めて多大なものである。

30

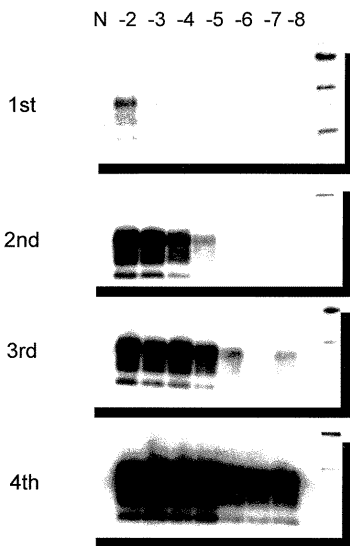
【 図 1 】



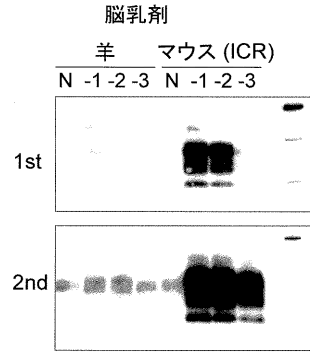
【 図 2 】



【 図 4 】

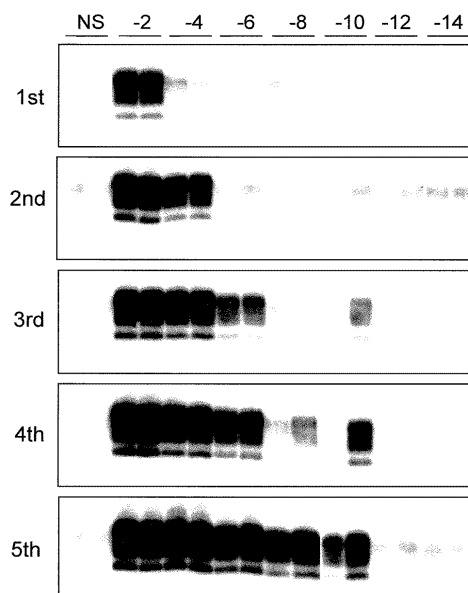


【 図 3 】



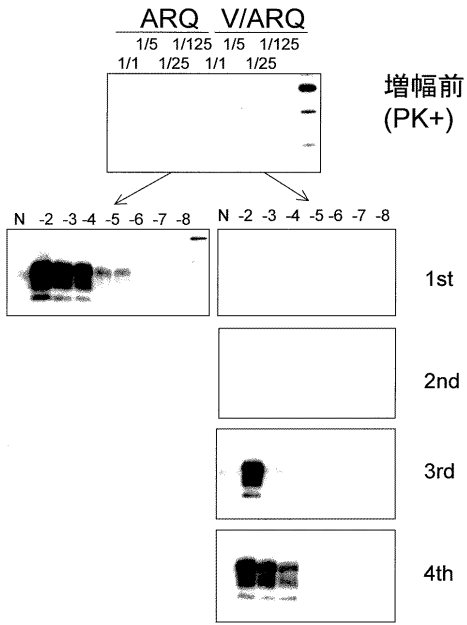
N: シード無添加コントロール  
スクレイピー感染羊脳乳剤添加  
(1/10 - 1/1,000)

【 図 5 】

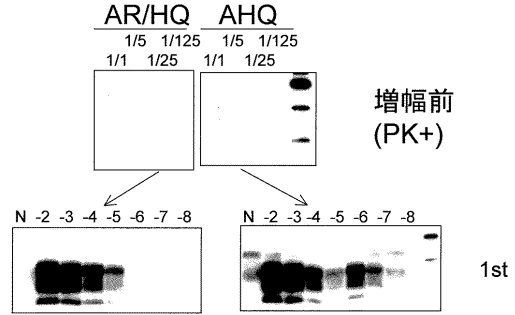


10%感染脳乳剤を希釈し、1/5継代で増幅を繰り返した。

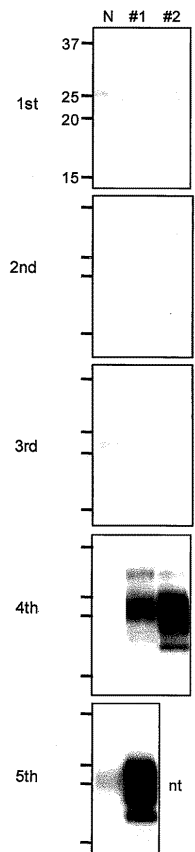
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/059617
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/47(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/47		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/113925 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 29 December, 2004 (29.12.04), Full text & US 2006/0154239 A1 & JP 2009-513927 A & EP 1636591 A1	1-4
X	WO 2005/001481 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 06 January, 2005 (06.01.05), Full text & US 2006/0166192 A1 & JP 2008-532475 A & EP 1636589 A1	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 28 July, 2009 (28.07.09)	Date of mailing of the international search report 11 August, 2009 (11.08.09)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059617

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/113915 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 26 October, 2006 (26.10.06), Full text & EP 1882188 A2 & US 2006/0263767 A1 & JP 2008-537155 A	1-4
A	JP 2004-292437 A (Masami MORIYAMA), 21 October, 2004 (21.10.04), Full text (Family: none)	1-4
A	MURAYAMA, Y., et al., Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein., Neuroscience letters, 2007, Vol.413, p.270-273, full text	1-4

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2009/059617									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/47 (2006.01) i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/47											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	WO 2004/113925 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2004.12.29, 全文 & US 2006/0154239 A1 & JP 2009-513927 A & EP 1636591 A1	1-4									
X	WO 2005/001481 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2005.01.06, 全文 & US 2006/0166192 A1 & JP 2008-532475 A & EP 1636589 A1	1-4									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 28.07.2009		国際調査報告の発送日 11.08.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 福澤 洋光	4 B 3963								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/059617
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/113915 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2006.10.26, 全文 & EP 1882188 A2 & US 2006/0263767 A1 & JP 2008-537155 A	1-4
A	JP 2004-292437 A (森山雅美) 2004.10.21, 全文 (ファミリーなし)	1-4
A	MURAYAMA, Y., et al., Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein., Neuroscience letters, 2007, Vol.413, p.270-273 全文	1-4



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(出願人による申告)平成19年度、農林水産省、「牛海綿状脳症(BSE)及び人獣共通感染症の制圧のための技術開発」委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願、及び、平成20年度、農林水産省、「BSE対策に資する基礎的知見の集積及び高精度検査技術の開発」委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 横山 隆

茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内

(72)発明者 毛利 資郎

茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所内

Fターム(参考) 4H045 AA20 CA40 EA20 EA50

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。