

平成21年6月20日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380183  
 研究課題名（和文）BSE血液中に逸脱する神経蛋白質と重金属の病態発症過程での役割と生前診断  
 研究課題名（英文）DIAGNOSIS OF BSE BY NEURONAL PROTEINS AND METALS IN THE SERA

研究代表者  
 横田 博（YOKOTA HIROSHI）  
 酪農学園大学・獣医学部・教授  
 研究者番号：90137414

研究成果の概要：

1. イギリスウェブブリッジ獣医学研究所より供与していただいた牛海綿状脳症罹患牛血清成分の解析を行った結果、グリア線維性酸性蛋白質（GFAP）に対する自己抗体と抗原 GFAP の逸脱を発見した。2. スクレーパーマウス感染実験系を確立し、プリオン病発症マウス血清中に低分子のペプチドを発見した。以上より、BSE牛血清中にGFAP自己抗体は神経細胞の崩壊によりGFAPの逸脱が生じていることが原因であり、これらを検出する事で生前診断できる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用獣医学

キーワード：獣医公衆衛生

**1. 研究開始当初の背景**

プリオン病に関するそれまでの研究には、次のような特徴があった。

(1) 実験動物を用いたものや試験管内でのプリオン蛋白質の重合変性に関するものがほとんどであり、BSEの試料を直接用いた研究はイギリスを除いては少ない。よって、BSE検査の改善につながる研究を推進する事が困難であった。

(2) BSE診断試験については、神経組織内で

の異常プリオンを検出するもので、確実であるが、神経組織の前処理を行わざるを得ず感染の危険性や感染源の飛散等が伴う。さらに、死後でないとは検出する事が不可能であった。よって、前頭殺処分など経済的にも社会的にも多くの問題を内包しており、獣医師の検査現場での混乱も生じていた。

本研究は、これらの限界点を克服すべく、プリオン蓄積過程で生じる様々な現象を神経特

## 異蛋白

質の血中への逸脱や重金属の変動を通して、その因果関係を明らかにし、簡便で安全な生前の血液検査を開発するものである。この測定原理は、必ずしも B S E 血液にのみ検出されるものでない場合がある。そこで、現在 1 0 0 0 頭分の各種疾患別に牛の血液を収集してある (小岩教授) ので、ELISA を用いて、多量の検査を可能とし、B S E の血液中には必ず検出され、且つ特異性の高いものを選定して行く。

## 2. 研究の目的

本研究は、スクレーパーマウス及び BSE 血清中に見出した神経特異蛋白質と重金属の病態発生過程での役割を明らかにし、BSE を始め多くの牛の症例に関して生前診断試験を行う事である。

## 3. 研究の方法

### (1) 血清を一次抗体に用いた WB

SDS-PAGE のサンプルは S-PEK によって分画したマウス小脳 (大脳以外) の各フラクションを調製したものをアプライし、Laemmli の方法に基づいて行った。WB は SDS-PAGE で分離後にメンブランに転写し、血清を希釈し 1 次抗体として用いて、二次抗体には HRP 標識抗ウシ IgG 抗体で抗原抗体反応を行い ECL にて検出した。

### (2) 2次元電気泳動と WB

2次元電気泳動は S-PEK による細胞骨格のフラクションを調製し、IPG ゲルを用いて等電点電気泳動を行い、続いて IPG ストリップを平衡化してから 2次元目電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。その後はゲルを CBB 染色してゲル中の蛋白質を可視化した。WB は SDS-PAGE (上記 1) 同様、電気泳動後にメンブランに転写し、血清を希釈し 1 次抗体として用いて、二次抗体には HRP 標識抗ウシ IgG 抗体で抗原抗体反応を行い ECL にて検出した。

### (3) トリプシンによるゲル内消化

WB にて確認した目的のスポットをゲルから切り出して、メスで細かくし CBB 脱色液に浸して脱色する。

その後、還元液を加え 56°C で 1 時間反応させ洗浄する。次にアルキル化液を加え遮光して 45 分間振盪し洗浄した。還元アルキル化後は、ゲルを脱水する工程の最終は 100%AN を加えてゲルを乾固させ、トリプシン溶液を加えて氷上静置で吸収させた。十分トリプシンがゲルに浸透したら 100mM

Tris Buffer 20  $\mu$ l を加えて 37°C で一晩インキュベートする。ペプチドの抽出は、さらに抽出液を 50  $\mu$ l 加え攪拌後に遠心沈殿させ、ゲルを吸わないように注意しながら上清をピペットで回収。この過程を二度行い、100% AN を加えて溶出させた上清を回収する。得られた上清は、遠心エバポレーターで濃縮して MS 解析用のサンプルとした。

### (4) MALDI-TOF MS による蛋白質の特定

MALDI-TOF MS での測定は、濃縮したペプチド溶液を ZipTip にて脱塩、濃縮したものを Matrix とともに金属プレートにアプライして、乾燥したものをレーザー照射しシグナルを得た。得られた複数のペプチドシグナルを Mascot 検索にかけて目的となる蛋白質を特定した。

## 4. 研究成果

現在までの経緯をまとめると、①スクレーパーマウス血清中に特異蛋白質を発見した。②上記成果を評価され、イギリスウエブブリッジ獣

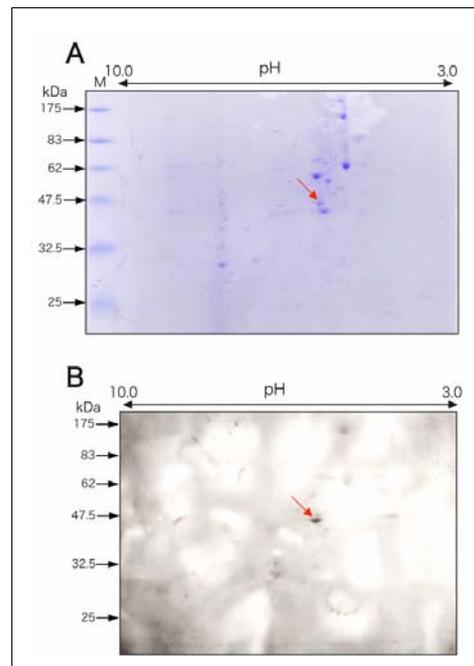


図-1 自己抗体の検出 A: 牛延髄蛋白質を二次元電気泳動で分離 B: BSE 牛血清を用いたウエスタンブロッティング 矢印の陽性スポットは質量分析の結果、神経特異蛋白質 GFAP と同定した

医学研究所より牛海綿状脳症罹患牛 5 0 頭分

の血清を分与された。③血清成分の解析を行った結果、グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) に対する自己抗体を発見した (図-1 参照、2008年度プリオン研究会発表、特許出願中)。④さらに、その抗原であるGFAPを同じ血清中に見出した。

(1) **BSE罹患牛血清中GFAP自己抗体の意味について** 今回、我々はBSE牛血清中に、神経組織のアストロサイト特異的蛋白質であるGFAPに対する抗体が作られていることを新たに発見した (図-1)。この発見により、未だ不明なプリオンの神経毒性の解明において、神経組織の変化を探る指標となる。さらに、血液を用いた生前診断への応用に関しても非常に重要な意味を持っている。

(2) **BSE 罹患牛血清中に GFAP 自己抗体発生機序について** 最近、我々は二次元ウエスタンブロッティングを用いて検索したところ、BSE 血液中に抗原蛋白質 GFAP を発見した。これまで検出できなかった原因は、1) GFAP の存在量がごく微量であること。2) 血液中には多量のアルブミンが混在しており、一次元ウエスタンでは多くの試料を用いることが出来なかったこと。3) GFAP の分子量がアルブミンと重なり、特異的バンドが検出できなかったことの3点であった。今回我々が用いた二次元電気泳動ウエスタンブロッティングにより、検出に成功したものであり、先の発見である自己抗体の発生機序を明らかにできた。BSE 牛の血清はイギリス以外の国特に日本に於いてはほとんど保存されていない。よって、今後 BSE 病態解析や我が国で発生したときの基準血清となる貴重な試料である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者は下線)

[雑誌論文] (計 29 件) 以下全て査読有  
研究代表者発表論文

1. Daidoji T, Ozawa M, Sakamoto H, Sako T, Inoue H, Kurihara R, Hashimoto S, Yokota H. Slow elimination of nonylphenol from rat intestine. *Drug Metab Dispos.* **34**, 184-190 (2006)
2. Daidoji T, Kaino T, Iwano H, Inoue H, Kurihara R, Hashimoto S, Yokota H. Down regulation of bisphenol A glucuronidation in carp during the winter pre-breeding season. *Aquat Toxicol.* **77**, 386-392 (2006).
3. Tanaka N, Miyasho T, Shinkyō R, Sakaki T, Yokota H. cDNA Cloning and Characterization

of Feline CYP1A1 and CYP1A2. *Life Science.* **79**, 2463-2473 (2006)

4. Matsumoto J, Iwano H, Inoue H, Iwano N, Yamashiki N, Yokota H. Metabolic Barrier against Bisphenol A in Rat Uterine Endometrium. *Toxicol Sci.* **99**, 118-125 (2007)
5. Kadokawa H, Matsumoto J, Yokota H. In vitro glucuronidation of estradiol-17beta by microsomes prepared using liver biopsy specimens from dairy cows. *J Vet Med Sci.* **69**(5), 557-559 (2007)
6. Taharaguchi S, Nagano A, Okai K, Miyasho T, Kuwano M, Taniyama H, Yokota H. Detection of an isoform of alpha(1)-antitrypsin in serum samples from foals with gastric ulcers. *Vet Rec.* **161**, 338-342 (2007)
7. Nomura, S., Daidoji, T., Inoue, H. and Yokota, H. Differential Metabolism of 4-n- and 4-tert-Octylphenols in perfused rat liver. *Life Sciences.* **83**, 223-228 (2008)
8. Wang SW, Kulkarni KH, Tang L, Wang J, Yin T, Daidoji T, Yokota H, Hu M. Disposition of Flavonoids via Enteric Recycling: UGT1As Deficiency in Gunn Rats Is Compensated by Increases in UGT2Bs Activities. *J Pharmacol Exp Ther.* **Mar 5**. (2009)
9. Kanae Y, Endoh D, Yokota H, Taniyama H, Hayashi M. Expression of the PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. *Am J Vet Res.* **67**, 127-133 (2006)
10. Okamoto M, Tanaka K, Tsunokawa M, Kasamatsu M, Yokota H, Tanida K, Kawasako K, Komine M, Akihara Y, Shimoyama Y, Hirayama K, Kikuchi N, Taniyama H. Small intestinal volvulus in a captive Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Vet Rec.* **159**, 21-23. (2006)
11. Kirat D, Inoue H, Iwano H, Hirayama K, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Vet J.* **171**, 462-427 (2006)
12. Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano

- H, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J Physiol.* **576**. 635-647 (2006)
13. Shimoyama Y, Akihara Y, Kirat D, Iwano H, Hirayama K, Kagawa Y, Ohmachi T, Matsuda K, Okamoto M, Kadosawa T, Yokota H, Taniyama H. Expression of monocarboxylate transporter 1 in oral and ocular canine melanocytic tumors. *Vet Pathol.* **44**(4) 449-457 (2007).
8. 14) Kibe R, Sakamoto M, Yokota H, Benno Y. Characterization of the inhabitancy of mouse intestinal bacteria (MIB) in rodents and humans by real-time PCR with group-specific primers. *Microbiol Immunol.* **51**(4) 349-357 (2007)
- 15) Kirat D, Inoue H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the liver of pre-ruminant and adult bovines. *Vet J.* **173**, 124-130 (2007).
- 16) Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, Miyasho T, Okamoto M, Saikawa Y, Ueda M, Yamada S, Tasaka S, Funakoshi Y, Hashimoto S, Yokota H, Maruyama I, Ishizaka A, Kitajima M. Neutrophil elastase inhibitor improves postoperative clinical courses after thoracic esophagectomy. *Dis Esophagus.* **20**, 478-486 (2007)
- 17) Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, Yamada S, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ishizaka A, Ogawa S. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* **81**, 565-73 (2009)
- 18) Sachiko Nomura, Taku Miyasho, Naoyuki Maeda, Katsumi Doh-ura, Hiroshi Yokota. Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform Encephalopathy. *Proteomics In press* (2009)

#### 研究分担者発表論文

- 1) Shimoyama Y, Yamashita K, Ohmachi T, Akihara Y, Sako T, Hirayama K, Okamoto M, Taniyama H. Pleomorphic adenoma of the salivary gland in two dogs. 2006. *J Comp Pathol.* 134: 254-259.
- 2) Akihara Y, Shimoyama Y, Ohya K, Hirayama K,

- Yoshida K, Matsuda K, Okamoto M, Taniyama H. 2006. Medullary sponge kidney in a 10-year-old Shih Tzu dog. *Vet Pathol.* 43: 1010-1013.
- 3) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H. Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Archives of Virology.* 2006. Vol. 151: 1267-1279.
- 4) Watanabe Y, Ibrahim MS, Hagiwara K, Okamoto M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Hayashi Y, Taniyama H, Ikuta K, Tomonaga K. 2007. Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility. *Microbes Infect.* 9: 417-427.
- 5) Kobayashi T, Kanai Y, Ono Y, Matoba Y, Suzuki K, Okamoto M, Taniyama H, Yagi K, Oku Y, Katakura K, Asakawa M. 2007. Epidemiology, histopathology, and muscle distribution of Trichinella T9 in feral raccoons (Procyon lotor) and wildlife of Japan. *Parasitol Res.* 100:1287-1291.
- 6) Okamoto M, Kamitani M, Tunoda N, Tagami M, Nagamine N, Kawata K, Itoh H, Kawasaki K, Komine M, Akihara Y, Shimoyama Y, Miyasho T, Hirayama K, Kikuchi N, Taniyama H. 2007. Mycotic aneurysm in the aortic arch of a horse associated with invasive aspergillosis. *Vet Rec.* 160: 268-270.
- 7) Okamoto M, Itoh H, Koiwa M, Inagaki M, Nadao T, Kurosawa T, Kawasaki K, Komine M, Akihara Y, Shimoyama Y, Miyasho T, Hirayama K, Taniyama H. 2007. Intussusception of the spiral colon associated with fibrous granulation in a heifer. *Vet Rec.* 160: 376-378.
- 8) Shimoyama Y, Kirat D, Akihara Y, Kawasaki K, Komine M, Hirayama K, Matsuda K, Okamoto M, Iwano H, Kato S, Taniyama H. 2007. Expression of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the dog intestine. *J Vet Med Sci.* 69: 599-604.
- 9) Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasaki K,

Komine M, Hirayama K, Kagawa Y, Omachi T, Matsuda K, Okamoto M, Kadosawa T, Taniyama H. 2007. Immunohistochemical evaluation of canine ovarian tumors. *J Vet Med Sci.* 69: 703-708.

10) Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasaki K, Komine M, Hirayama K, Terasawa A, Ohmachi T, Matsuda K, Okamoto M, Taniyama H. 2007. Histological and immunohistochemical evaluation of canine ovary. *Reprod Domest Anim.* 42: 495-501.

11) Komine M, Kawasaki K, Akihara Y, Shimoyama Y, Okamoto M, Matsuda K, Hirayama K, Taniyama H. 2007. Multiple hepatic peribiliary cysts in a young pig. *Vet Pathol.* 44: 707-709.

12) Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasaki K, Komine M, Hirayama K, Kagawa Y, Omachi T, Matsuda K, Okamoto M, Kadosawa T, Taniyama H. 2007. Immunohistochemical evaluation of canine ovarian cysts. *J Vet Med Sci.* 69: 1033-1037.

[学会発表] (計 3 件)

1. 野村幸子, 宮庄 拓, 戸邊美智子, 志賀康弘, 前田尚之, 堂浦克美, 横田 博 “牛海綿状脳症罹患牛血清に検出されたグリア線維性酸性蛋白質に対する自己抗体” 2007 年プリオン研究会 発表
2. 戸邊美智子, 宮庄 拓, 野村幸子, 伊藤暁史, 松田一哉, 川崎ゆり, 堂浦克美, 毛利資郎, 横田 博 “スクレイピーマウス血清中における疾患特異的蛋白質の検出” 2008 年プリオン研究会 発表
3. 野村幸子, 宮庄 拓, 前田尚之, 堂浦克美, 横田 博 “牛海綿状脳症罹患牛血清中に検出されたグリア線維性酸性蛋白質” 第 146 回日本獣医学会学術集会 発表

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 特願 2002-320579  
内分泌攪乱物質の影響を低減化する組成物
2. 特願 2008-068132  
ラクトフェリンを有効成分とする UCP 発現促進剤

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 博 (YOKOTA HIROSHI)

酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号:90137414

(2) 研究分担者

谷山弘行 (TANIYAMA HIROYUKI)

酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号:90133800

小岩政照 (KOIWA MASATERU)

酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号:90094820

中出哲也 (NAKADE TETUYA)

酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号:90145991

松田一哉 (MATUDA KAZUYA)

酪農学園大学・獣医学部・教授  
研究者番号:90405660

(3) 連携研究者

なし