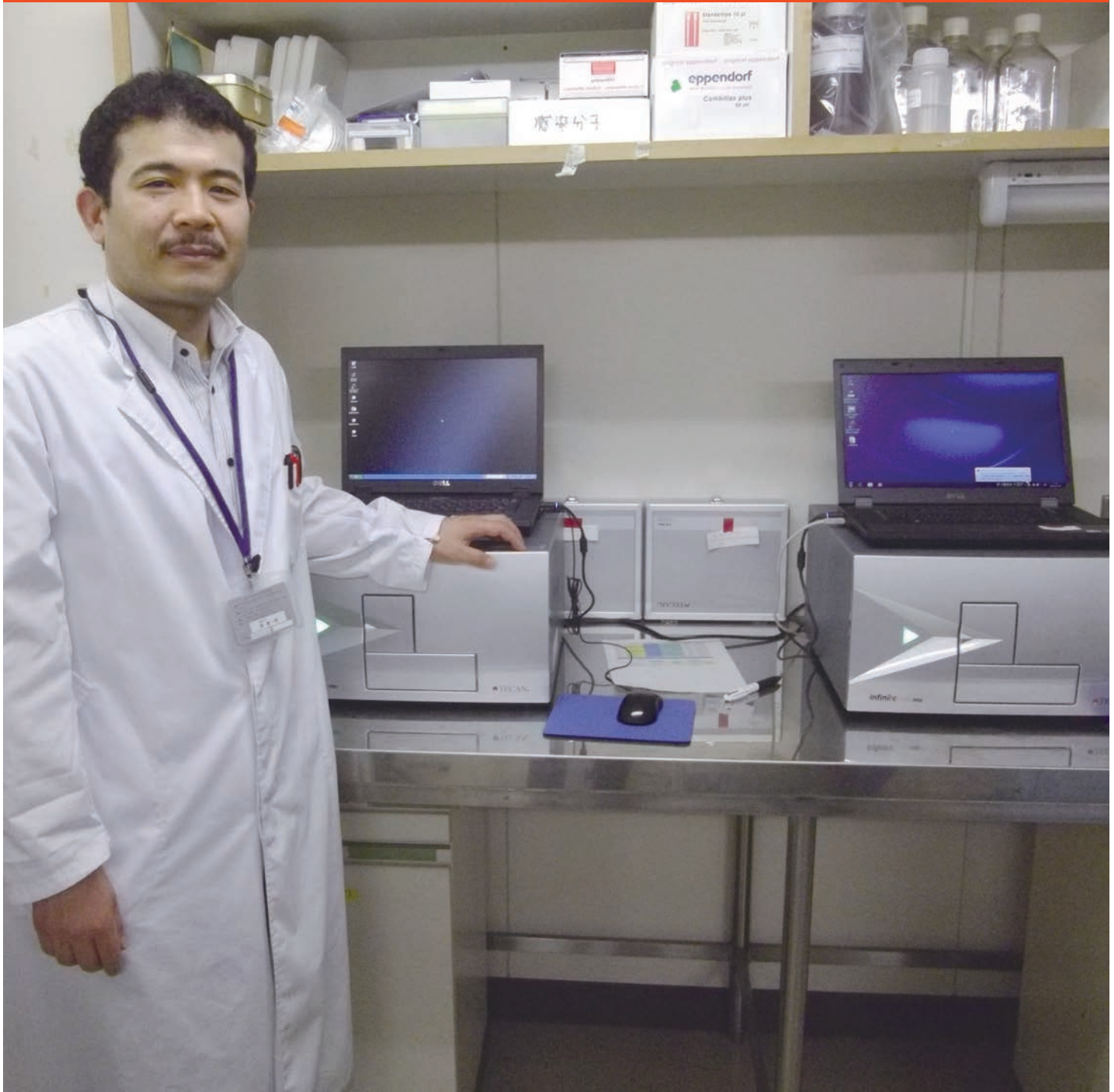


長崎大学の研究グループが 生前の CJD 検出法を開発

長崎大学の研究グループが、Tecan のインフィニット 200 シリーズ プレートリーダーを使用して、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）疑い患者の髄液サンプルからプリオンを検出する高感度診断手法を確立し、信頼性の高い生前診断への期待を高めた。



長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子解析学教室 助教 新 竜一郎 博士とインフィニット 200 PRO プレートリーダー

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子解析学教室では、プリオンについてそのメカニズムと伝達性海綿状脳症 (TSE) の感染病原体としての性質を研究している。プリオン病は、致死性の神経変性疾患であり、代表的な疾患にヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、牛の BSE (牛海綿状脳症、狂牛病とも言う) などがある。

感染分子解析学教室 助教の新 竜一郎 博士は、次のように語る。「プリオンは、健康な動物やヒトと同じアミノ酸配列を持つものの、構造に異常があるタンパク質です。『細胞性プリオン タンパク質 (PrP^C)』と呼ばれる正常な構造のタンパク質は、大部分がモノマーですが、異常型プリオン タンパク質 (PrP^{Sc}) は、βシート構造の多いアミロイド様のポリマーを形成します。この正常型から異常型への構造の変化は、PrP^{Sc} が PrP^C と接触することで凝集が誘発されて起こります」

ヒトのプリオン病として最も一般的な孤発性 CJD は、PrP^C が自然発生的に PrP^{Sc} へと変換され、増殖して発症に至ると考えられている。孤発性 CJD はさきわめてまれな疾患で、年間発症率は 100 万人に 1 例程度である。また CJD のうち、10 分の 1 ~ 2 程度を占めると考えられる遺伝性プリオン病は、PrP^C をコードする遺

伝子の変異によるものであり、患者の加齢とともに症状が進む。BSE 発症牛からプリオンが感染する変異型 CJD や、CJD 汚染硬膜の移植による感染性 CJD などを含め、TSE は公衆衛生に大きな影響を与えている。

新 博士は語る。「多くの動物実験から、早期に治療を開始することの重要性が示されています。しかしこれまでは、発症前や発症早期における早期診断法が確立されていませんでした。CJD などのプリオン病では、PrP^{Sc} が検出されることが確定診断と同等の意味を持ちますが、生前の確定診断に必要な脳生検には高いリスクが伴います。そのため我々は、CJD の早期確定診断法を確立することを目的として、患者の髄液に含まれる微量の PrP^{Sc} を *in vitro* で増幅できるアッセイの開発を中心に研究活動を開始しました。この研究は、Tecan のインフィニット 200/200 PRO シリーズ プレートリーダーを使用して順調に進んでいます。これは *E. coli* に発現させたりコンビナント PrP (rPrP) を反応基質として微量の PrP^{Sc} を増幅する手法で、Real-Time Quaking-Induced Conversion (Real-Time QUIC) 法と呼ばれます。激しく攪拌することで反応が促進され、rPrP が凝集してフィブリルが形成されます。rPrP のフィブリル形成反応には PrP^{Sc} が不可欠です。サンプルに PrP^{Sc} が含まれてい

なければ、この反応は起こりません。もちろん自然発生的な反応が起こる可能性もありますが、PrP^{Sc} の存在下で起こる反応とは容易に区別できます」

チオフラビン T は、アミロイド フィブリルに特異的に結合して蛍光を発するため、その強度を 10 分ごとに 48 ~ 72 時間測定し、フィブリル形成の反応過程を観察するために使用される。新 博士は語る。「実験段階で CJD 患者由来の髄液を用いて PrP^{Sc} を検出したところ、Real-Time QUIC の感度は 80% 以上、特異度は 100% でした。これは患者の生存中に CJD の疑い例を迅速に診断できる高い能力を示すもので、早期治療への期待が高まっています。変異型 CJD は、試験サンプルの入手が困難ですが、Real-Time QUIC は、この検出にも効果を発揮すると思われます。また遺伝性 CJD サンプルの試験は、現在実施中です。

Real-Time QUIC 法への発展にインフィニットプレートリーダーの導入は必須でした。今回の研究では、激しく攪拌するほど反応が促進されることがわかったため、プログラム可能な激しい攪拌機能が不可欠でした。自動制御のプレートリーダーを導入するまでは、専用のシェーカーを使用していました。プリオンは、煩雑なウェスタンブロット法で検出していました。インフィニットリーダーは、ただちに結果が得られ、1 回で最高 96 サンプルを測定できます。また感染の可能性があるプリオンを装置内に封じ込めるため、これまでのプロセスよりもはるかに安全です」

新 博士は最後にこう締めくくった。「我々は、インフィニットのモノクロメーターベースとフィルターベースのモデルを使用しています。最近 4 台目の装置を導入しました。今後は、これらのプレートリーダーを他の研究にも利用したいと強く願っています」

Tecan のインフィニット 200 PRO シリーズプレートリーダーについては、www.tecan.co.jp/infinite200PRO をご参照ください。

■この記事は2011年9月発行 Tecan Journal 3/2011 に掲載されているユーザーストーリーを抜粋、翻訳したものです。ご質問、ご要望は下記までお願いします。

テカンジャパン株式会社

TEL. 044-556-7311/FAX. 044-556-7312
E-mail: infojapan@tecan.com



新 竜一郎 博士と研究室のみなさん