

クロイツフェルト・ヤコブ病の臨床像： 2000年に施行されたサーベイランスの成績

班 員：佐藤 猛（国立精神・神経センター国府台病院）
班 員：中村 好一（自治医大・公衆衛生）
班 員：堂浦 克美（九大・脳研・神経病理）
班 員：立石 潤（老人保健施設・春風）
研究協力者：新井 公人、岡田 真一（千葉大・神経内科、精神科）
研究協力者：上杉 秀二（国立精神・神経センター武蔵病院精神科）
研究協力者：森若 文雄（北海道大・大学院脳科学・神経内科）
研究協力者：志賀 裕正（東北大・医・神経内科）、
研究協力者：小林 央（新潟大・脳研・神経内科）
研究協力者：水澤 英洋、袖山 信幸（東京医歯大・大学院総合研・神経内科）
研究協力者：増田 眞之（東京医大・第三内科）
研究協力者：黒岩 義之、戸田 宏章（横浜市大・医・神経内科）
研究協力者：岩淵 潔（神奈川県総合リハビリセンター）
研究協力者：山田 正仁（金沢大・医・神経内科）
研究協力者：葛原 茂樹（三重大・医・神経内科）
研究協力者：西川 隆（大阪大・大学院医・精神科）
研究協力者：黒田 重利（岡山大・医・精神科）
研究協力者：村井 弘之（九大・脳研・神経内科）
班 長：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

[研究要旨]

1996年厚生省緊急研究として行われたCJDの全国調査、および2000年4月から本研究班の事業として各ブロック毎のサーベイランス委員によって行われた全国のCJD患者の訪問調査の成績に基づいて、次の諸問題についてまとめた。(1)硬膜移植歴を有するCJDの原因と初発症状。これまでの調査で把握された硬膜移植CJD患者70例中、硬膜の種類が確認された63例は全てアルカリ処理前の旧Lyoduraが使用されていた。初発症状は小脳失調が多く、PSD陰性例や緩徐進行例も存在していた。(2)CJDとの鑑別が難しかった3例の前頭葉型痴呆をまとめた。1剖検例は脳のプリオン蛋白染色が陰性であり、CJDが否定された。経過が長く、脳波や画像所見が典型的CJDと異なることが、鑑別診断上の要点である。(3)家族性CJDの中でプリオン遺伝子に変異が認められた62例について、変異の種類と臨床像についてまとめた。従来報告されている典型例以外に痴呆のみで数年間経過する症例が存在していた。家族歴がないと記載されていた症例が40%存在しており、初期の遺伝子検査の重要性を指摘した。

Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan

¹Takeshi SATO, ²Yoshikazu NAKAMURA, ³Katsumi Doh-ura, ⁴Jun TATEISHI,
⁵ Kimihito ARAI, ⁶Shinichi OKADA, ⁷Shuji UESUGI, ⁸Fumio MORIWAKA,
⁹Hiroshi SIGA, ¹⁰Hiroshi KOBAYASHI, ¹¹Hidehiro MIZUSAWA, ¹²Nobuyuki
SODEYAMA, ¹³Masayuki MASUDA, ¹⁴Yoshiyuki KUROIWA, ¹⁵Hiroaki TODA,
¹⁶Kiyoshi IWABUCHI, ¹⁷Masahito YAMADA, ¹⁸Sigeki KUZUHARA, ¹⁹Takashi

¹Kohnodai Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, ²Department of Public Health, Jichi Medical School, ³Department of Neuropathology, University of Kushu, ⁴Brain Research Laboratory, Genetic Health Care Facilities, Harukaze, ⁵Department of Neurology and Psychiatry, University of Chiba, ⁶Department of Psychiatry, Musashi Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, ⁷Department of Neurology, University of Hokkaido, ⁸Department of Neurology, University of Tohoku, ⁹Department of Neurology, University of Niigata, ¹⁰Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University School, ¹¹Department of 3rd Internal Medicine, Tokyo Medical University, ¹²Department of Neurology, Yokohama School of Medicine, ¹³Kanagawa Center of Rehabilitation, ¹⁴Department of Neurology, Kanazawa University School of Medicine, ¹⁵Department of Neurology, Mie University School of Medicine, ¹⁶Department of Psychiatry, University of Osaka, ¹⁷Department of Psychiatry, University of Okayama, ¹⁸Department of Neuropathology, University of Kyushu, ¹⁹Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

ABSTRACT

- (1) The 1st and 2nd nationwide survey documented 70 patients with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) who had received cadaveric dura mater grafts during the period between January 1979 and September 1991. At least 63 patients received the same brand of dura mater grafts from the same processor. The results suggested that patients with dural grafts differ from cases of sporadic CJD in terms of clinical features with respect to a younger age at onset of the disease and more frequent cerebellar ataxia in the initial symptoms.
- (2) We describe 3 patients with a clinical suspicion of CJD. An autopsy case failed to confirm the suspected CJD; the final diagnosis was dementia with fronto-temporal lobes atrophy.
- (3) The survey demonstrated that 9 point mutations and two different length octarepeat insertions were identified in prion protein gene examined. The most common disease-associated mutations are codon 102 (Pro→Leu) and codon 200 (Gln→Lys). Approximately, 40% of cases with prion protein gene mutations lack a clear family history of a similar disorder.

[はじめに]

1996年に行われた全国疫学調査により日本におけるクロイツフェルト・ヤコブ病の疫学、および臨床像について報告されている¹⁾。当時の調査はアンケート形式で回答をもとに臨床症状などがまとめられた。1999年度からは特定疾患治療研究事業の医療費の公費給付制度における申請書に添付する臨床個人調査票をもとに、本研究班のなかのサーベイランス委員により個別に調査が行われるようになり、情報がより正確に把握されるようになった。今回の調査をもとに硬膜移植歴を有するCJD患者で移植された硬膜の種類、あるいは初発症状など前回の調査結果と比較した。

さらに1996年の全国調査で若年発症CJDと記載された症例の追跡調査、およびCJDとの鑑別診断が問題となった前頭葉型痴呆の症例を紹介する。

プリオン蛋白の遺伝子の変異を有する症例が全国調査と今回のサーベイランスで62例把握されたので、従来、立石²⁾、北本ら³⁾により報告されていた遺伝子の変異と臨床的特徴にさらに付け加えた問題点を紹介する。

[目的]

これまで行われた2回にわたるCJDの全国調査に基づいて、(1) 硬膜移植CJDの原因と臨床像の特徴、(2) CJDとの鑑別診断が問題となった特異な痴呆症候群、(3) 家族性CJDにおけるプリオン蛋白遺伝子の変異と臨床的特徴について報告する。

[方法]

1996年(平成8年)に行われた厚生省「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査」では調査票の郵送による調査が行われた。調査対象期間は1985年1月から1996年5月までの間で、829名のCJD患者が把握された(回収率78.2%)。次いで2000年に厚生省「遅発性ウイルス感染調査研究班」の中のサーベイランス委員によって1999年から2000年にわたって特定疾患として登録されたCJD患者165名について直接の訪問、あるいは電話などによる詳細な調査が行われた。これらの方法によって得られた調査表をもとに種々の検討がなされた。なおプリオン遺伝子の解析は北本、および立石、堂浦班員により行われた。

[倫理面への配慮]

CJD患者の調査時には患者、および家族、さらに医療機関のプライバシーの保護に出来るだけ配慮することを約束して、調査結果まとめることにした。さらに家族性CJDなどについての情報開示の方法などについては厚生省公衆衛生審議会や本研究班のサーベイランス委員会に諮問して、了解を得るようにした。

[結果]

(1) 硬膜移植CJDの原因と初発症状の特徴

硬膜移植歴を有するCJD患者はこれまでに70例が把握された。その中、63例はB.Braun社のアルカリ未処理の旧Lyoduraが移植されていた。7例は1985年以降の脳外科手術で硬膜は使用されているが、B.Braun社のLyoduraかBiodynamics社のTutoplastの何れが使用されたのか不明な症例であった。

旧Lyoduraが使用されていた症例の一部は既に報告してあるが^{4,5)}、今回、把握されたわが国の症例と文献で旧Lyoduraが移植されていたと記載されているCJDの外国例13例とにおける硬膜が移植された手術年代を図1にまとめた。1983年から1987年の間に旧Lyoduraの移植を受けた患者から多くのCJDが発症している。この傾向は外国例でも同様であった^{6,7)}。

1985年10月以降はわが国ではヒト乾燥硬膜製品としてTutoplastも使用されている。また1988年からはLyoduraは1N NaOHで処理された新Lyoduraが使用されているが、現在までに旧Lyodura以外の硬膜の移植歴を有するCJD患者は確認されていない。このことは旧Lyoduraが如何にCJD発症と因果関係が深いかを示している。

硬膜移植を受けてからCJD発症までの潜伏期間は1年数ヶ月から16年におよんでいる。1983年から1987年の間に硬膜移植受け、発症したCJD患者を手術年毎に累積してみると、16年後でもなお患者数は増加している。中村班員がこの傾向をすでに報告しており⁸⁾、今後もさらに新たな硬膜CJD患者の発生を予測しているが、本報告ではグラフで示してみた(図2)。潜伏期が20年としても今後さらに硬膜CJD患者は増加を続け、恐らく総数100名に達するものと予想される。

硬膜CJDは初発症状として小脳失調が多いことが特徴と全国調査(平成9年度)で報告した。この時は調査票の記載に基づいたが、今回は直接、訪問調査であり、症状の把握はより正確であった。初発時の小脳失調は硬膜CJDが10例中7例(70%)、孤発例が82例中16例(19.5%)であり、硬膜CJDでの特徴が確認された。

無動性無言までの期間がCJDで早いことが、他の痴呆疾患との鑑別上重要である。コドン129がM/Mのホモで調査すると、孤発例では平均 4.4 ± 3.4 、硬膜例では 5.6 ± 4.8 ヶ月であった。孤発例では13ヶ月が1例、硬膜例では13,16,17ヶ月が各1例であり、緩徐進行例が認められた(図3)。M/Vのヘテロは孤

発例3例、硬膜例2例が存在していたが、無動までの期間はホモと同様であった。

(2) CJD との鑑別が難しかった症例

2回にわたるCJDの全国疫学調査の際、CJDとしての診断が問題となった3症例を紹介し、今後の調査における鑑別診断の参考としたい。

[症例1] 前頭・側頭葉型痴呆・パーキンソニズムを呈した若年発症の1剖検例（第二次 No.5）

（岡田真一、新井公人、千葉大学精神科、神経内科）

発症時26歳男性、家族歴なし。1991年9月、1週間の発熱後、不眠、集中力低下、4ヶ月後無関心などの脱抑制的精神症状で発症、パーキンソニズム、ミオクローヌス、錐体路症状を呈し、15ヶ月後無動性無言に陥った。脳波ではPSDは認められなかった。髄液は正常、プリオン蛋白の遺伝子変異はなく、コドン129はMet/Met、219はGlu/Gluであった。第1回全国疫学調査では若年CJD疑いとして登録され、報告された⁹⁾。8年後、死亡。剖検の結果、前頭葉と側頭葉は萎縮が高度で、神経細胞は脱落、グリアの増生が著明であった。免疫染色ではプリオン蛋白は検出されず、CJDが否定された。なお光顕ではピック小体やレビー小体、ballooned neuronなどは認められなかったが、大脳白質、橋白質に α -synuclein陽性のglial coiled body類似の繊維構造物が認められた。

[症例2] 前頭葉型痴呆・パーキンソニズムを呈し、緩徐な経過を示した非CJDの1例（第一次 No.310）

（上杉秀二、国立精神・神経センター武蔵病院精神科）

発症時38歳女性、家族歴なし。1991年春、書字不能、計算不能、歩行が前傾、小刻みなどで発症した。1年後入院、無関心、失見当識、失認、失行、失禁、徘徊などが認められた。当時は錐体路、錐体外路症状は認められなかった。髄液異常なく、脳波では棘徐波複合がみられたが、典型的PSDは認められなかった。プリオン蛋白遺伝子の変異はなく、コドン129はMet/Metであった。経過を追って撮影されたMRIでは前頭・側頭葉の萎縮が著明、PETでは前頭・側頭葉でrCBFが低下していた。1993年5月には了解不能となり、顔面けいれん、筋強直、クローヌスなどが認められ、寝たきり、無動性無言となった。1994年11月に死亡したが、剖検は家族の同意が得られなかった。

本例は第一次調査時にはCJDも否定できないとして回答されたが、カルテ調査で前頭葉型若年痴呆が疑われ、CJDは否定された。

[症例3] 前頭葉型痴呆・パーキンソニズムを呈し、緩徐な経過を示す非CJDの1例（第二次 No.156）

（佐藤 猛 東大和病院神経内科）

発症時59歳女性、家族歴無し。1998年12月近くのスーパーの場所が分からない、レンジの火が付けられない、物がゆがんで見える、幻覚などで発症、1999年7月、尿閉にて緊急入院、痴呆、着衣失行、筋強剛、手指の静止時振戦、不規則なミオクローヌスなどが認められた。髄液は正常、NSE 14ng/dl、脳波では不規則な徐波群がみられたが、PSDは認められなかった。CT、MRIでは側脳室前角の軽度拡大のみが指摘された。同年8月、CJD疑いにて感染新法に基づく届け出がなされた。

在宅で療養していたが、痴呆は漸次進行、無関心状態が強くなり2000年1月からは寝たきりの状態となった。しかし、7月頃でも挨拶など簡単な応答は可能、12月には単語の復唱は可能であった。2年経過しても無動性無言にはならないため、この時点でCJDを否定し、前頭葉型痴呆と診断した。

(3) 家族性CJD

1996年に行われた第1回全国調査では1985年から1996年5月までの間に829例のCJD患者が把握された（回収率78.2%）。次いで本研究班での第2回全国調査により165名のCJDが認められた。両調査を合わせ994名のCJD患者中75名の家族性CJDが認められた。プリオン蛋白の遺伝子変異の検索が施行されていた患者は63例であり、遺伝子の挿入、あるいは点変異が記載されているものは62例、変異が

認められなかったもの1例であった。

これらの家族性、あるいは遺伝子 CJD の個々の症例については既に報告されているものが多く、また遺伝子変異の部位と病型についても報告されているが、本報告では遺伝子変異の種類と頻度、さらに記載されている典型例以外の特殊例についてもまとめたので紹介することとする(表1,2)。さらにプリオン蛋白遺伝子には変異が見出されなかった1家系も紹介する(表3)。

Octapeptide の挿入は 4 repeats のものと、6 repeats のものとが報告された(表1)。4 octapeptide repeats の症例は小脳にクールー斑が認められている。6 octapeptides repeats の挿入例は34歳の若年発症で進行性痴呆と構音・嚥下障害で発症、6ヶ月後に小脳失調と歩行障害が認められているが、6年経過してもミオクローヌスはなく、無動性無言の状態にもなっていない。

コドン102の点変異の症例は21例であり、遺伝子異常の認められたもの62例の中で最も多く、失調で始まるGSSであり、九州に多くみられた。大部分の症例は失調、歩行障害、構音障害で初発し、6ヶ月後にミオクローヌス、痴呆などの症状が出現していた。しかし、2例のみは不安などの精神症状で初発し、数ヶ月後に失調が発現していた。

コドン105の点変異例は対麻痺型GSSとして知られているが、4例中2例のみ痙性麻痺で発症、2例は痴呆で初発し、7年以上痴呆のみで経過している。

コドン145の点変異例は出生がフィリピンの症例で、39歳で発病、10年以上痴呆のみで経過している。

コドン180の点変異例は痴呆、あるいは不安などの精神症状、または失調で初発、比較的緩徐な経過をとる。

コドン198の点変異は1例報告されているが、痴呆、行動異常などで発症、1年後無動になっているが、やはり緩徐進行性である。

コドン200の点変異は14例報告されており、症状は孤発性CJDに類似しているが、発症年齢が平均 57 ± 11 歳と孤発性より若干若かった。コドン200の変異を有する症例の地域集積性についてはこれまでいくつかの報告があるので、別の論文にまとめて報告する。

コドン210の点変異は1例報告されている。孤発性CJDと同様の経過をとり、6ヶ月で死亡している。

コドン232の点変異は13例みられた。出生地は全国にわたっていたが、家族歴を有するものは3例のみで、他は孤発例であった。発症年齢は 60.4 ± 9.7 歳で孤発性CJDとほぼ同じ年齢であり、初発症状と経過も類似していた。また病理所見も免疫組織化学ではプラークはなく、シナプス型であった。

遺伝子解析にて変異が見出されなかった1家系が存在していた(表3)。調査した症例(Ⅱ-7)は行動異常、無関心などで発症、3年後着衣失行など認められ、4年後失読、失書、失行が著明となり、腱反射亢進、筋強剛、MRIにて前頭・頭頂葉の萎縮が指摘されている。脳波ではPSDが認められず、経過8年で無動性無言状態、現在、入院中である。同胞9人中、6名が発症しており、2例は剖検で大脳白質に広汎な病変が認められており、1例は免疫染色にてシナプス型のプリオン蛋白が証明されている。

[考察と結論]

(1) 硬膜移植CJDの原因と初発症状の特徴

硬膜移植CJD患者はこれまでに70例が認められた。その中、使用された硬膜の種類が確認されたものは63例で、すべてB.Braun社のアルカリ処理以前の旧Lyoduraが使用されていた。移植が行われた脳外科の手術は1983年から1987が多く、発症までの期間は16ヶ月から17年に及んでいる。毎年新しい患者がまだ発生していることから、潜伏期が仮に20年とすると、硬膜移植CJDの患者数は総数100名近くに達することが予想される。

今回の第二回サベイランスの結果をふまえ、硬膜移植CJD患者は以下のような特徴を有する。①硬膜移植CJD患者は若年発症の傾向にある、②小脳失調での初発が多い、③無動性無言までの期間が長い症例が存在する、④脳波でPSDが認められない症例が多い、⑤剖検でFlorid plaqueと呼ばれる特異なクールー斑を有する症例の存在などである。

(2) CJDと鑑別が難しかった症例

2回にわたる全国調査でCJD疑い例として登録された症例の中で特異な前頭葉萎縮を示した痴呆の3症例が存在していた。1例は剖検脳の免疫組織化学の結果、プリオン蛋白の沈着は陰性であったことから、CJDが否定された。発症年齢は2例は26歳と38歳の若年であった。3例とも発症してから無動性無言になるまでの期間がほぼ2年あり、脳波ではPSDが認めれず、画像でも前頭・側頭葉の萎縮が高度にもかかわらず、後頭葉の萎縮が認められていない。今後、CJDとの鑑別診断上、参考にすべき症例と考え報告した。

(3) 家族性 CJD

プリオン蛋白遺伝子の変異が記載されている62例について、その種類と臨床をまとめて紹介した。従来、報告されている典型的なGSSの失調、あるいは痙性対麻痺などの症状とは別に数年にわたって緩徐に進行する痴呆の症例が存在していた。ミオクローヌスや脳波上のPSDを欠く症例もみられた。

さらにプリオン遺伝子変異が見出されなかった1家系も存在していた。

遺伝子変異が認められた64例中、家族歴が記載されていたものは55例、その中で家族歴がないと報告された症例は22例、40%であった。緩徐進行性CJDはアルツハイマー病、前頭葉型痴呆、皮質基底核変性症、びまん性レビー小体病などとの鑑別が問題となるが、CJDを念頭において出来るだけ早くプリオン蛋白遺伝子の解析を行うのが大切である。

[参考文献]

- 1) 厚生省「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査研究班報告書」(班長 佐藤 猛) 1997年3月。
- 2) 立石 潤: クロイツフェルト・ヤコブ病—遺伝的要因。スロウウイルス感染とプリオン、山内一也、立石 潤 編、近代出版、東京、1994、pp214-226
- 3) Kitamoto T, Amano N, Terao Y et al.: A new inherited prion disease (prP-P105L mutation) showing spastic paraparesis. *Ann Neurol* 34:808-813, 1993
- 4) Sato T, Hoshi K, Yoshino H et al: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan, January 1979-May 1996. *MMWR* 1997; 46:1066-1069
- 5) Hoshi K, Yoshino H, Urata J et al: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* 55: 718-721, 2000
- 6) 佐藤 猛、星 研一、増田真也他: 医原性プリオン病: ヒト硬膜移植後に発症したクロイツフェルト・ヤコブ病、*神経進歩* 43:145-154
- 7) Brown P, Preece M, Sato T et al: Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 55: 1075-1081, 2000
- 8) Nakamura Y, Yanagawa H, Kitamoto T et al: Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric dura mater transplantation in Japan. *Epidemiol Infect* 125:201-205, 2000
- 9) 岡田真一、篠田直之、武田直巳他. 前頭葉型痴呆とパーキンソニスムを呈した若年痴呆の1症例. *老年精神医学誌* 10: 183-190, 1999

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) Hoshi K, Yoshino H, Sato T et al: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* 55: 718-721, 2000
- 2) Brown P, Preece M, Sato T et al: Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 55: 1075-1081, 2000

図 1 硬膜移植患者の手術年

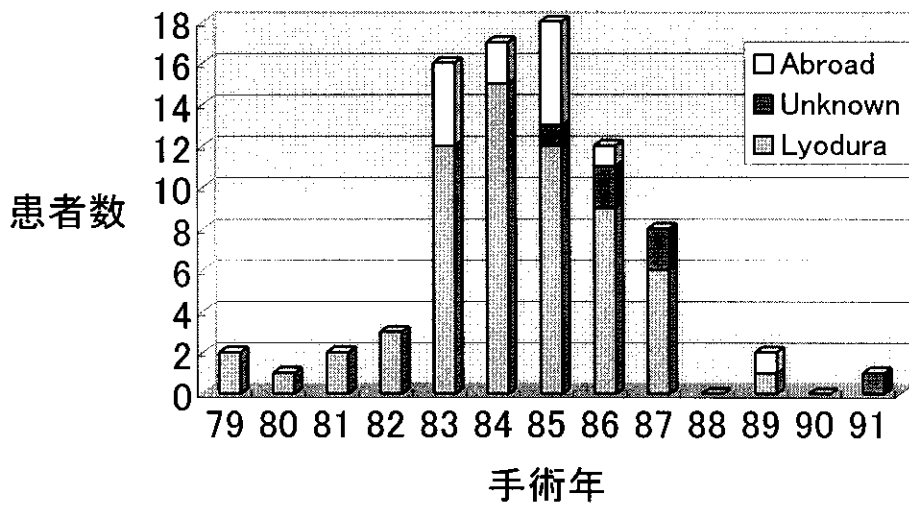


図 2 硬膜移植年別の患者発生状況

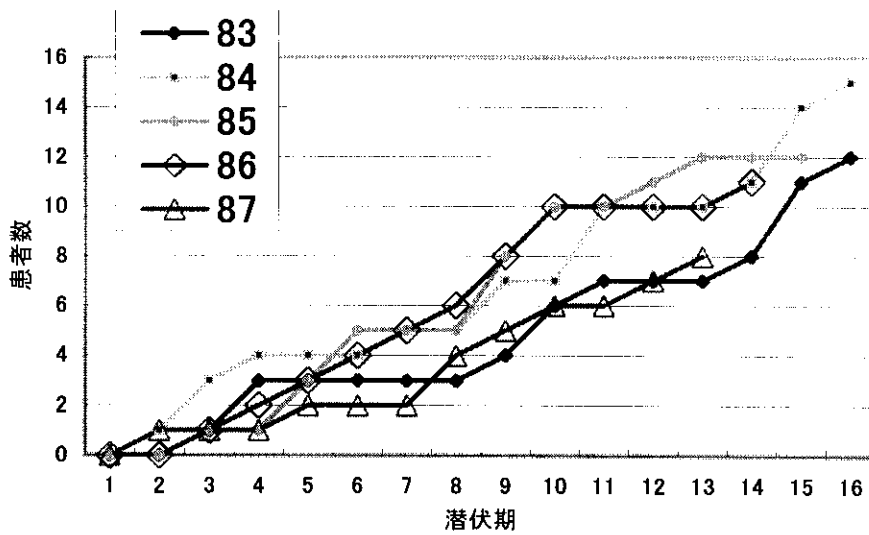
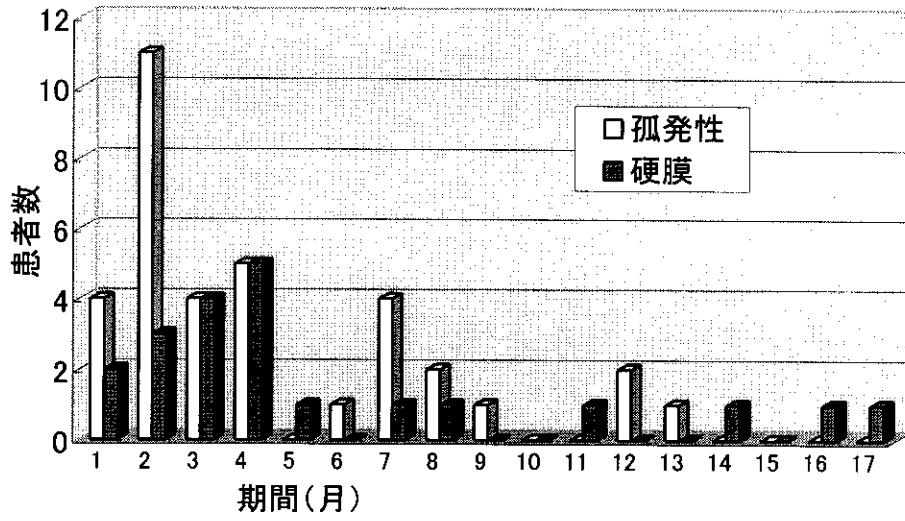


図3 無動無言までの期間



(孤発性:4.4±3.4ヶ月, 硬膜:5.6±4.8ヶ月)

表1 家族性CJD:挿入

Insert size	患者数	遺伝形式	発症年齢	死亡までの期間(年)	臨床的特徴	PSD	神経病理	文献
96bp (Four octapeptide repeats)	1	孤発性CJD	63	7	発症は歩行障害、3年後振戦、4年後記憶力低下、ミオクローヌス、6年後無動	末期に+	小脳にクールー斑	Isozaki:Dementia 8:363-371,1994
144bp (Six octapeptide repeats)	1	家族性CJD	34	6年以上生存中	進行性痴呆+構音・嚥下障害、小脳失調	-		Oda:Acta Neuropath 90:80-86,1995

表2 家族性CJD:点変異

コドン/変異	患者数	遺伝形式	発症年齢	死亡までの期間(年)	臨床的特徴	PSD	神経病理	文献
102(Pro→Leu)	22	大部分は失調性GSS	52.2±12.1 (30~66)	5±2.7 (2~11)	失調、歩行障害、構音障害で発症、記憶障害、腱反射亢進など伴う。6ヶ月後半数にミオクローヌス、6~9ヶ月で無動、2例は不安で初発、数ヶ月後失調	末期に20%が+	クールー斑2例、びまん性2例	
105(Pro→Leu)	4	癩性対麻痺型GSS、痴呆型	45 (40~49)	7~11	癩性対麻痺型2例、痴呆で初発の2例は7年以上他の症状なし	-	クールー斑1例	Yamada M et al.J Neurol Sci 134:215-216,1995
145(Try→Stop)	1	家族性CJD	39	20	進行性痴呆、10年後ミオクローヌス	-	びまん性	一宮洋介他、Dementia 8:391-396,1994
180(Val→Ile)	5	孤発性CJD	72.6±5.9 (65~79)	2~6	痴呆、不安、性格変化、行動異常、または失調で初発、1年後ミオクローヌスは2例、無動は3例	1例のみ+	光顕：びまん性	Ischida S.Neuroradiol 37:531-34,1995
180(Val→Ile) 232(Met→Arg)	1	孤発性CJD	84	1	痴呆で初発、9ヶ月後わずかなミオクローヌス	-	光顕：びまん性	Hitoshi Set al.J Neurol Sci 120:208-12,1993
198(Phe→Ser)	1	家族性CJD	56	3年以上	痴呆、行動異常で発症、1年後ミオクローヌス、無動	-		池内 健、134回日本神経学会関東地方会、1995.9.9
200(Gln→Lys)	14	家族性CJD	57±11 (44~78)	0.6~1	初発は痴呆、不安、失見当識が多く、感覚障害、幻覚、失調、反射亢進もある。6~9ヶ月で全例、ミオクローヌス	全例+	光顕：7/7クールー斑なし 免疫：1例びまん性	赤井淳一郎他、神経進歩 23:472-283,1979、 岩淵 潔他、脳神経46:349-352,1994、
210(Arg→Lys)	1	家族性CJD	60	0.6	不安、不眠、幻覚、痴呆、ミオクローヌスで発症、急速に嚥下障害、歩行不能、3ヶ月後無動	初期に+	なし	Furukawa et al.J Neurol Sci 141:120-122,1996
232(Met→Arg)	13	孤発性CJD、家族性CJD	60.4±9.7 (50~73)	1.6±0.9 (0.3~3.5)	痴呆、不安、性格変化、行動異常で初発、失調3例、感覚1例、視覚1例、3ヶ月後ミオクローヌス、無動	ほぼ全例+	光顕：3/3クールー斑なし 免疫：2/2 びまん性	大隅まり他Dementia 8(4),1994

表3 コドンの変異が検出されない家族性CJD

Insert size	患者数	遺伝形式	発症年齢	死亡までの期間(年)	臨床的特徴	PSD	神経病理	文献
なし	1	家族性CJD	54	生存：8年以上	痴呆、行動異常にて初発、ミオクローヌスなし、無動は未だ	-		高津ら。神経内科 9:365-373,1978

KOマウスおよびニワトリを用いたPrP特異的モノクローナル抗体の作成

班 員：松田治男（広島大学・生物生産・免疫生物）
班 員：毛利資郎（九州大学・大学院医・動物施設）
班 員：北本哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：中村尚登（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：朱山亜希（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：青木悠里（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：堀内浩幸（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：古澤修一（広島大学・生物生産・免疫生物）
研究協力者：村本 環（東北大学・大学院医・病態神経）

〔研究要旨〕

PrPノックアウトマウスとニワトリを用いて、PrP特異的モノクローナル抗体の作成を試みた。ScN2a免疫PrPノックアウトマウスを用いた細胞融合実験から、マウスPrPに反応する抗体が得られたが抗体産生が減少し、クローニングまでには至らなかった。HuPrP121-230リコンビナントペプチド免疫PrPノックアウトマウスを用いた細胞融合実験からは4種（#9, 30, 172；IgMタイプおよび175；IgG1タイプ）のモノクローナル抗体を得ることができ、そのうち#175は主として一糖鎖・無糖鎖型PrPを認識していることが分かった。残りの抗体はタグプロテインであるマルトース結合タンパク（MBP）と交差反応を示した。一方、リコンビナントHuPrP23-230免疫ニワトリ脾細胞からのファージ発現抗体作成実験では、PK感受性および抵抗性領域の抗体が得られたが、抵抗性領域を認識する抗体すべてがMBPと交差反応を示すものであった。

Establishment of Monoclonal Antibodies against PrP using PrP-Knockout Mouse and Chickens

Haruo MATSUDA, Naoto NAKAMURA, Aki SYUYAMA, Yuri AOKI, Hiroyuki HORIUCHI, Shuichi FURUSAWA, Shirou MOHRI¹, Tamaki MURAMOTO² and Tetsuyuki KITAMOTO²

Department of Immunobiology, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, ¹Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyusyu University and ²Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

We developed several monoclonal antibodies against the human prion protein (PrP) in mouse and chickens. In fusion experiment using recombinant HuPrP120-230 immunized-PrP knockout mice, 4 kinds of anti-HuPrP monoclonal antibodies were generated. Of these, #175 antibody was analyzed with Western blotting and epitope mapping. In Western blotting using brain homogenate sample from CJD patients, the antibody was reactive to one- and non-glycoform PrP but not to two-glycoform PrP. The epitope for #175 was mainly located at the position of 175-216 A.A of HuPrP. The remaining antibodies were not only reactive to HuPrP peptide, but also to MBP as a tag-protein in recombinant PrP expression. On the other hand, some recombinant antibodies to PK-sensitive or -resistant PrP were generated by using spleen cells from the chicken immunized with HuPrP. However, the antibodies against PK-resistant region were cross-reacted with MBP.

〔はじめに〕

Korthらの報告（1）以降、PrPsc特異抗体樹立の報告はなされていない今日、異常プリオンタンパクの診断・研究を推進するためにも、実績のあるニワトリ（2, 3, 4）やPrPノックアウトマウス（5, 6）を利用した汎用性のあるPrP特異抗体さらにはPrPsc特異抗体の早期樹立が望まれる。今年度は、ニワトリ免疫脾細胞から作成したファージ発現抗体ライブラリーとPrPノックアウトマウスを利用し、細胞工学・免疫工学的手法を用いてPrP特異抗体の樹立を行った。

〔目 的〕

異常プリオンタンパクを診断するイムノアッセイ法をよりの確にかつ高感度なものにするためには、

信頼できるモノクローナル抗体を数多く作成することが重要である。本研究では、ニワトリとPrPノックアウトマウスを免疫動物として活用し、PK抵抗性領域PrP特異的モノクローナル抗体を樹立することを試みた。

〔材料と方法〕

1. 実験動物

実験動物として、白色レグホン種純系ニワトリH-B15およびPrPノックアウトマウスを使用した。動物福祉の観点から、使用したこれらの実験動物の使用数を最小限にするとともに、飼育環境に配慮するため実験動物舎の衛生管理を徹底した。使用後の実験動物は、広島大学生物生産学部附属農場の実験動物用焼却炉で焼却し、同農場主催の動物慰霊祭に参列することで実験に供した動物の霊に感謝を表した。

2. 免疫

4週齢ニワトリに、pMal発現リコンビナントHuPrP (23-231, 121-230) を三週間おきに腹腔内へ免疫した。また、ノックアウトマウスにはPrPsc感染細胞株ScN2a, ヒトPrP121-230を同様に免疫した。

3. 細胞融合による抗体作成

細胞融合実験は、ノックアウトマウスの免疫脾細胞とマウスミエローマ細胞株SP2/0を用いて常法に従って行った。

4. PrP特異的ファージ発現抗体の作成

前年度報告した方法でファージ発現抗体ライブラリー (2.7×10^7 CFU/ μ g vector) を作成し、リコンビナントHuPrP23-230, PK・SDS処理MoPrPsc (マウス馴化スクレイピー帯広株) を抗原とするパニング法を用いてPrP特異的ファージ発現抗体を選抜した。

5. ELISA

ハイブリドーマ培養上清とファージ発現抗体の反応性は、ELISA法を用いた。リコンビナントHuPrP, MoPrPおよびPK・SDS処理したMoPrPsc をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清およびファージ発現抗体を加えて反応後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス κ 鎖抗体を用いて検出した。

6. ウェスタンブロットニング

ウェスタンブロットニングは、ネイティブMoPrPcおよびHuPrPscを泳動サンプルとし、ファージ発現抗体ならびに#175抗体を一次抗体として使用した。検出は、Alkaline-phosphatase/NBT/BCIPもしくはperoxidase/ECLで行った。

7. エピトープ解析

#175抗体のエピトープ解析は、pGEXベクターを用いて種々の長さで発現させたGST融合HuPrPペプチドを用いたウェスタンブロットニングで解析した。

〔結 果〕

1) PrP特異的ファージ発現抗体の作成

免疫脾細胞から調製したcDNAを材料に 2.7×10^7 CFU/ μ g vectorのファージ発現抗体ライブラリーを得た。HuPrP23-231でパニングを行いクローニングした結果、N末側PrPを主に認識する抗体のみが得られた(図1)。これらのファージ発現抗体について、正常マウス脳から調製したPrPを用いてウェスタンブロットニングをしたところ、いずれの抗体もマウスPrPを特異染色した(図2)。一方、PK・SDS処理したMoPrPscで選抜したファージ発現抗体は、いずれもMBPと交差反応するものであり、ウェスタンブロットニングでは非特異染色が多数観察された。

2) PrPノックアウトマウスを用いたPrP特異的マウスモノクローナル抗体の作成

HuPrP121-230免疫ノックアウトマウスを用いた融合実験から、PrPを認識するモノクローナル抗体4クローンを樹立した(#9, 30, 172; IgMおよび175; IgG1)。そのうち3種のIgM型抗体はいずれもMBPに交差反応することが分かった(図3)。一方、IgG1型抗体の#175はMBPに交差反応することなく、ウェスタンブロットの結果からも主にヒトPrPの一糖鎖型および無糖鎖型を特異的に認識することが分かった(図4)。昨年度報告したScN2a細胞免疫からの融合実験では、1クローンが得られたがその後の抗体産生能は悪くクローニングには至らなかった。

3) #175抗体のエピトープ解析

リコンビナントヒトPrP断片を利用した#175のエピトープ解析の結果、HuPrP175-216残基を必須認識領域とし、N末端側へ135残基目、C末端側へ224残基目まで伸長させるに従って反応性が増幅することが分かった(図5, 6および7)。

〔考 察〕

今回のPrP特異的マウスモノクローナル抗体作成実験において、得られたマウスモノクローナル抗体#175は、C末端側の2つのヘリックス構造を主に認識するヒト型プリオンタンパク特異抗体であり、さらにこの抗体は二糖鎖型PrPを認識できないことも分かった。今後、無糖鎖型を認識しない抗体を樹立することにより、これらの抗体を利用したプリオンタンパクと糖鎖の関係について研究できることが期待できる。

一方、#175と同時に得られた三種のIgM抗体はいずれもMBPと交差反応を示した。この結果は、MBPの分子量が大きいためリコンビナントPrPと安定的な立体構造をとってしまい比較的認識しやすいエピトープ形成をしたためと考えられた。今後PrP特異的抗体を効率よく樹立するためには、すでに確立されているHisタグ結合PrPや今回は抗体樹立に至らなかったがPrPsc産生細胞(ScN2a)を免疫原とした作成法が優れていると思われる。これに関しては現在進行中で、今後の成果が期待される。

また、同時に行ったリコンビナントHuPrP23-230免疫ニワトリ脾細胞からのファージ発現抗体作成実験では、ライブラリーサイズを 10^7 スケールまで拡大することに成功し、免疫原でパニングを行ったものからPrP特異的抗体が得られた。この抗体は、HuPrP121-230やMBPとは全く反応せず、HuPrP23-230や正常マウスPrPを用いたウエスタンブロットで反応性を示すことから、少なくともヒト・マウス共通領域のN末側を認識しているものと思われる。また、PK処理したマウスPrPscを抗原としたパニングで得られた抗体は、いずれもMBPと交差反応性を示すものであった。リコンビナント抗体の特異性は、ハイブリドーマ由来抗体とは異なり抗体VHとVLのシャッフリングに依存することから、これらの交差反応性はVHとVLの認識の違いが原因である可能性があり、すでに構築されているPrP特異的抗体の遺伝子を人工的に組み換えることによりPrP特異的になることが期待できる。

〔参考文献〕

- 1) Korth C., Stierli B., Streit P., Moser M., Schaller O., Fischer R., Schulz Schaeffer W., Kretzschmar H., Raeber A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Billeter M., Wuthrich K. and Oesch B.: Prion (PrPsc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature (Lond.)* 390: 74-77, 1997
- 2) Groschup M. H., Harmeyer S. and Pfaff E.: Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J. Immunol. Methods* 207: 89-101, 1997
- 3) Matsushita K., Horiuchi H., Furusawa S., Horiuchi M., Shinagawa M. and Matsuda H.: Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 777-779, 1998
- 4) Matsuda H., Mitsuda H., Nakamura N., Furusawa S., Mohri S. and Kitamoto T.: A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.*, 23: 189-194, 1999
- 5) Krasemann S., Groschup M., Harmeyer S., Hunsmann G. and Bodemer W.: Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0}-mice. *Mol. Med.* 2: 725-734, 1996
- 6) Williamson R. A., Peretz D., Smorodinsky N., Bastidas R., Serban H., Mehlhorn I., DeArmond S. J., Prusiner S. B. and Burton D. R.: Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7279-7282, 1996

〔研究発表〕

1. 論文発表
 - 1) Nakamura N., Aoki Y., Horiuchi H., Furusawa S., Yamanaka H., Kitamoto T. and Matsuda H.: Construction of recombinant monoclonal antibodies from a chicken hybridoma line secreting specific antibody. *Cytotechnol.*, 32: 191-198, 2000
 - 2) Kitao H., Arakawa H., Kuma K., Yamagishi H., Nakamura N., Furusawa S., Matsuda H., Yasuda M., Ekino S. and Shimizu A.: Switch recombination of the chicken IgH chain genes: implications for the primordial switch region repeats. *Int. Immunol.*, 12: 959-968, 2000

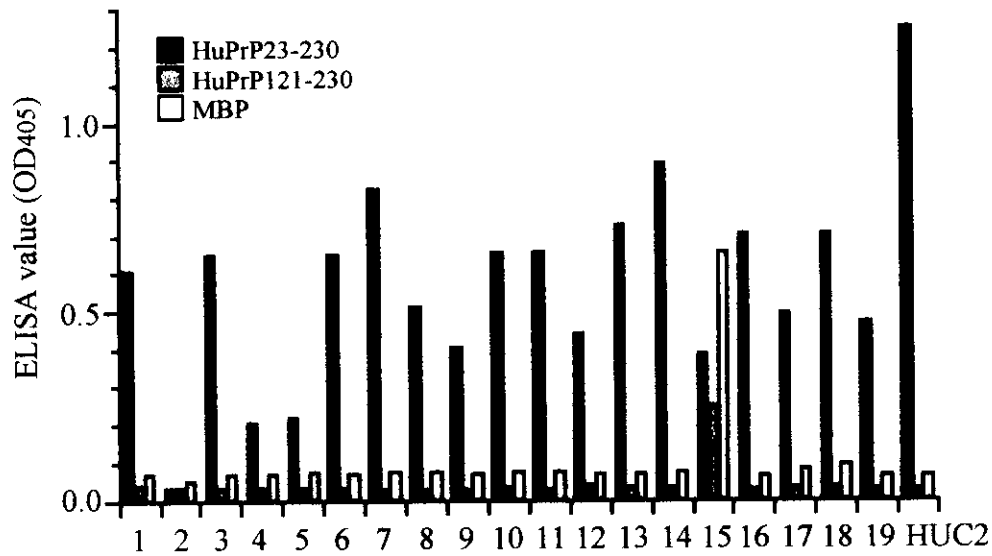


Figure 1
 Binding specificity of the phage-displayed monoclonal antibodies (ELISA). The antibodies were selected by panning procedure using HuPrP23-230 antigen. Black, gray and white bars indicate the immunoreaction against HuPrP23-230, HuPrP121-230 and MBP, respectively.

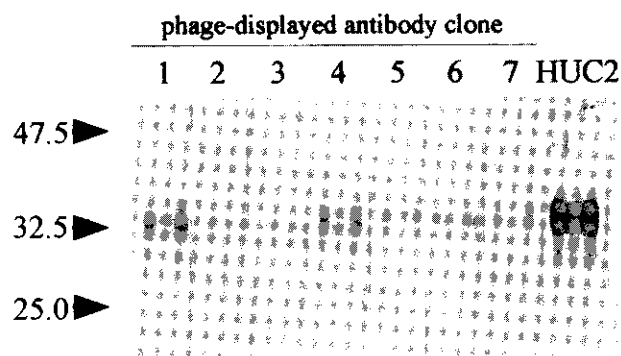


Figure 2
 Western blotting profiles of mouse brain homogenate using phage-displayed antibody. Color development was performed by alkaline-phosphatase/NBT/BCIP system.

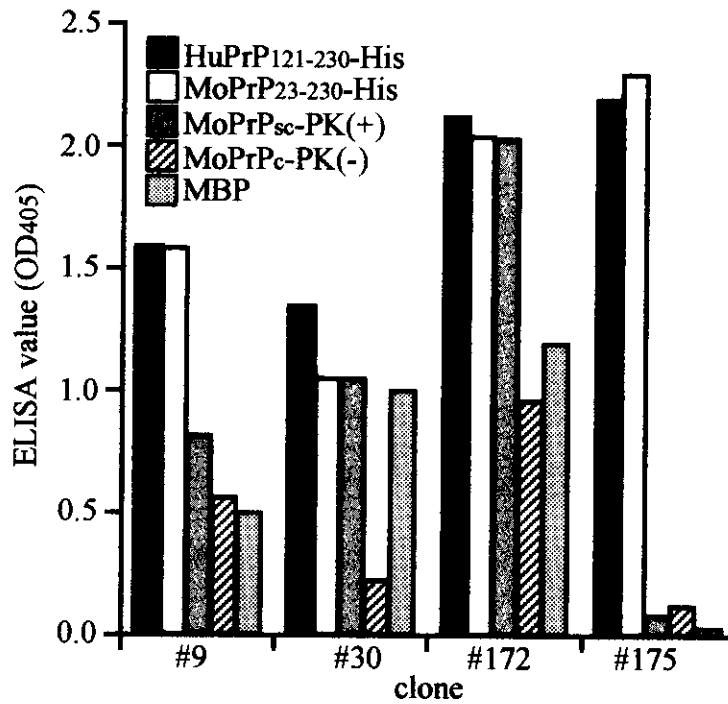


Figure 3
Binding specificity of the mouse monoclonal antibodies against various antigen (ELISA). Black, white, gray, slash and dot bars indicate the immunoreaction against HuPrP121-230, MoPrP23-230, MoPrPsc treated with protease K, MoPrPc untreated with protease K and MBP, respectively.

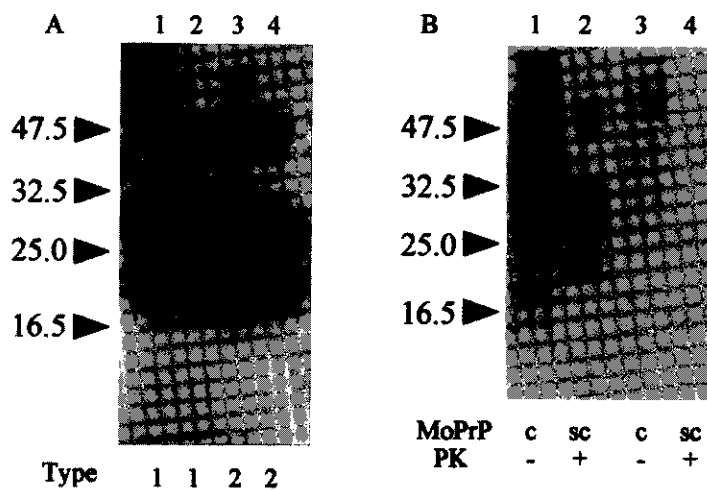


Figure 4
Western blotting profiles of human PrP (A) and mouse PrP (B) using #175 monoclonal antibody (ascites, 1:2,000). Color development was performed by peroxidase/ECL system. (A) lanes 1 and 2: type-1 human PrPsc treated with protease K, lanes 3 and 4: type-2 human PrPsc treated with protease K. (B) lanes 1 and 3: mouse PrPc untreated with protease K, lanes 2 and 4: mouse PrPc treated with protease K. Lanes 1 and 2 were stained with 3-6A-12-8 antibody. Lanes 3 and 4 were stained with #175 antibody.

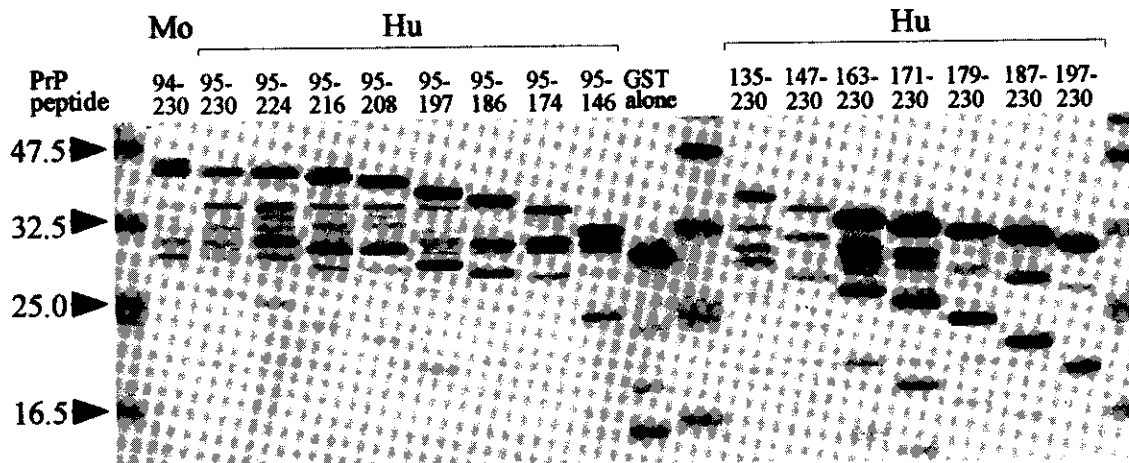


Figure 5
Western blotting profile of GST-PrP fusion peptides using anti-GST polyclonal antibody (Sigma, 1:1,000). Color development was performed by alkaline-phosphatase/NBT/BCIP system.

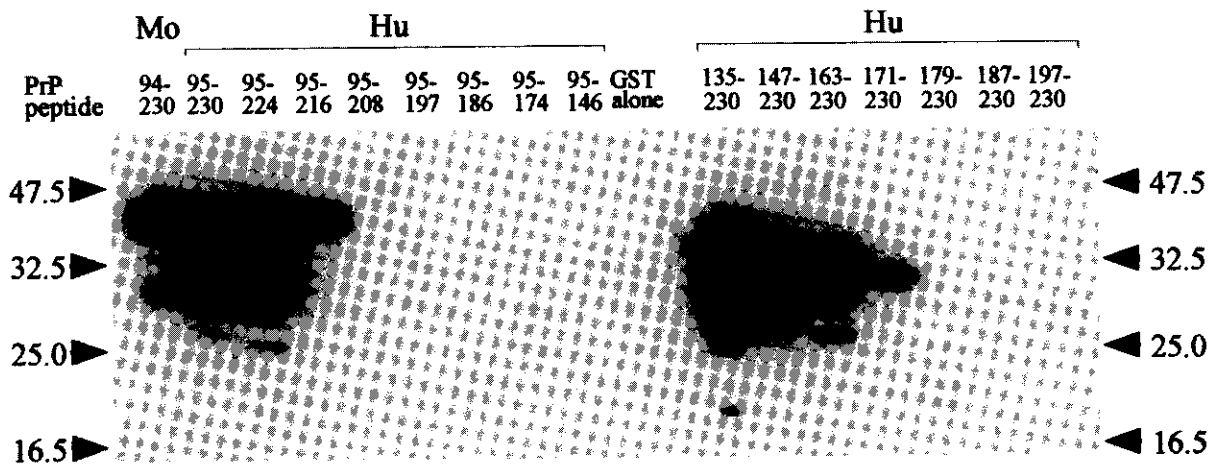


Figure 6
Western blotting profiles of GST-PrP fusion peptides using #175 monoclonal antibody (ascites, 1:2,000). Color development was performed by peroxidase/ECL system.

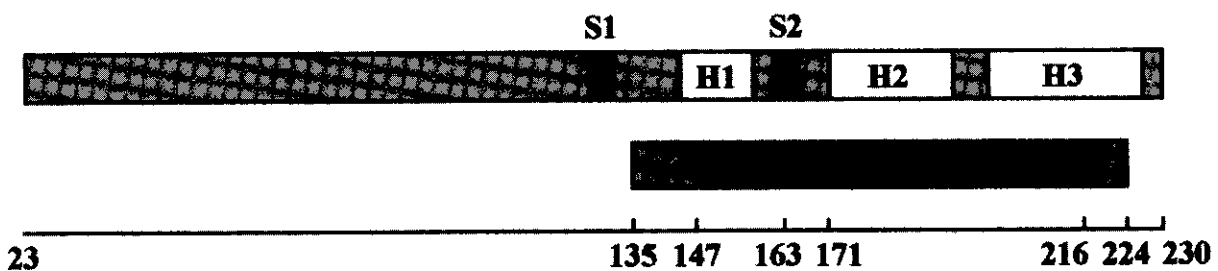


Figure 7
The location of the epitope for the #175 monoclonal antibody. The uppermost figure: a scheme of human PrP structure. Figure at the mid-position (the location of the epitope) : black bar indicates the essential part for the immunoreaction; gray bars indicate parts of the epitope which contribute to enhance the immunoreaction: parts in darker gray contribute more.

可溶性プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の作製

班 員：田中 智之（堺市衛生研究所）
協 力 者：北元 憲利（姫路工業大学・環境人間学部・生活環境）
協 力 者：村本 環（東北大学・大学院医・病態神経）
班 員：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物）

【研究要旨】

可溶性プリオン蛋白（sPrP）に対するモノクローナル抗体（MAb）の作製を試み、4つの ELISA 陽性クローンを得た。このうち3クローン（s#9、s#2065 および s#383）はウェスタン・ブロット法で陽性を示したため、エピトープ解析を行った。その結果、クローン s#9 は PrP163-224、s#2065 は PrP163-216、また s#383 は PrP147-224 番アミノ酸がそれぞれ抗原として必須であることが判明した。

一方、固相ポリクローナル抗体—検出 MAb を用いたサンドイッチ ELISA 法を試みたところ、sPrP の検出が可能であったが、感度の向上等、今後の課題も残された。

Production of monoclonal antibodies to human soluble prion protein which expressed by vector of *E.coli*.

Tomoyuki TANAKA¹⁾, Noritoshi KITAMOTO²⁾, Tamaki MURAMOTO³⁾,
Tetsuyuki KITAMOTO³⁾ and Shiro MOHRI⁴⁾

1) Sakai-city Institute of Public Health

2) Humanities for Environmental Policy and Technology, Himeji Institute of Technology

3) Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

4) Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Kyushu University

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (MAbs) to soluble prion protein (sPrP) which was expressed by *E.coli* vector were obtained. Four clones produced MAb in sPrP antigen-coated ELISA assay and three of them were positive by Western blotting analysis. By epitope mapping of these three clones, s#9, s#2065 and s#383 reacted with the regions 163-224, 163-216 and 147-224 of PrP, respectively.

Detection of sPrP by ELISA assay system was developed in combination with polyclonal rabbit antibody to purified human amyloid plaque as a capture antibody and MAbs to sPrP as a detector antibody. The reaction titer of these MAbs by OD in ELISA were relatively low. However, one MAb (#4) which was obtained previously showed high reaction with sPrP.

【はじめに】

プリオン蛋白（PrP）あるいは異常 PrP の異常蓄積によるプリオン病の病因過程は明らかでない。いろいろな可能性の中で可溶性プリオン蛋白（sPrP）がどのような形で存在し、役割を担うのかを知ることは意味ある事と思われる。

今回、大腸菌発現された sPrP に対して、モノクローナル抗体（MAb）の作製を試み、それを用いて、可溶性プリオンの中枢神経組織上での局在、*in vitro* での検出系の確立について検討した。

【材料と方法】

1) 大腸菌発現された Histidine-tag を持つ sPrP (HuPrP122-231-His) を抗原としてマウスに免疫した。免疫マウスは PrP 遺伝子欠損マウス (PRN) を用いた。MAb の作製およびスクリーニングはこれまでに報告した方法および sPrP 抗原固相 ELISA 法で行なった^{1) 2)}。使用マウスは、すべてエーテル麻酔下にて脾臓摘出を行いマウス生命の尊厳を保った。

2) 得られたクローンのエピトープマッピングについても平成 11 年度の研究報告書と同様に行なった¹⁾。すなわち、glutathione-s-transferase (GST) の C 末端側に PrP 23-230 番アミノ酸の種々の部位に相当するペプチドを付加した融合蛋白を、pGEX プラスミドベクター (Fig. 1) を用いて大腸菌に発現させた。上記スクリーニングで PrP との反応性が認められた各種 MAbs (腹水) を一次抗体 (2000 倍希釈) とし、大腸菌溶解液をサンプルとするウエスタン・ブロット法を行い、抗体が反応する PrP ペプチドをマッピングした。

3) sPrP 検出のためのサンドイッチ ELISA 法の開発は以下のように行なった。固相抗体としてアミロイド斑から抽出した蛋白に対するウサギ抗体 APC を用いた。検出抗体には sPrP に対する MAbs (今回得られた s#9 および s#2065 の他、最近新たに得られた s#281, s#348, s#396, s#65 および s#49)、および前回 pMal プラスミド発現 PrP (Mal-PrP) で得られた MAbs (#4 および #8 抗体の他、別のケースで得られた #29, #36, #37, #712, #720, #744, #745, #752, #754 および #758) を用いた。具体的にはポリスチレン製 96 ELISA プレートに APC 抗体を 250, 1,000, 2,000 倍希釈して固相した。20ng/well の割合で sPrP を 37℃, 2 時間反応し、その後、希釈 MAb を同様に 37℃, 2 時間反応した。HRPO 標識抗マウス IgG 抗体を用い H₂O₂ 下で ABTS にて呈色した。

【結 果】

1) 今回得られた 4 クローン (s#9, s#2065, s#383 および s#209) は ELISA 法にて陽性であった。それぞれサブクローニングを行なった。腹水化したこれらの抗体は、ELISA で 16,000 倍以上の抗体価を示したが、1 クローン (s#209) は 2,000 倍であった。先の 3 クローンはウエスタン・ブロット法および免疫染色で陽性であったが、1 クローン (s#209) は陰性であった。

2) GST-PrP 融合蛋白を発現させた大腸菌の溶解液総蛋白をサンプルとし、ヤギ抗 GST 抗体 (Sigma) を一次抗体とするウエスタン・ブロット法により、各融合蛋白の発現を確認した (Fig. 2)。同じサンプルに対する各 MAb の免疫反応性を調べるウエスタン・ブロット法の結果、昨年度報告した Mal-PrP に対する TNT#71 は PrP171-224 が抗原として必要であり、215I/219E/220R を含む部位にエピトープが存在するとして昨年度報告結果と合致した (Fig. 3)。今回得られた s#9 は、PrP163-224 が抗原として必須であり、N 末側を 147 番まで、あるいは C 末側を 230 番まで延長することで抗原性が向上した (Fig. 4)。s#2065 は、PrP163-216 が抗原として必須であり、N 末側を 147 番まで、あるいは C 末側を 230 番まで延長することで抗原性が向上した (Fig. 5)。また、s#383 は、PrP147-224 が抗原として必須であり、N 末側を 147 番まで延長することで抗原性が向上することが分かった (Fig. 6)。マウス PrP23-230 との反応性は s#2065 が最も強く、次いで s#383 と s#9 であり、TNT#71 は全く反応しなかった (Figs. 3-6 の左端の lanes, Mo)。これら MAbs のエピトープの局在を、分子内二次構造の分布と対比させた (Fig. 7)。

3) サンドイッチ ELISA 法の検出抗体に用いた MAbs の中で、Mal-PrP に対する #4 抗体および sPrP に対する抗体 (s#65, s#49 および s#348) に陽性反応が認められたが、特に #4 抗体は強い陽性反応を示した (Fig. 8)。

【考 察】

PrP の中枢神経系への沈着経路は不明な点が多い。また感染型 PrP がどのような構造をとっているのかも不明である。今回は sPrP に主眼点を置き、それを認識する MAb の作製および sPrP 検出系の樹立の可能性について検討を開始した。

大腸菌発現の sPrP に対する MAb を作製したところ、今回得られた抗体はヒト型 PrP の 147-224 領域を認識する抗体で、クロイツフェルド・ヤコブ (CJD) 症例の中枢神経系組織の免疫染色においても陽性反応を示した。しかし、我々が以前に作製した TNT#41/71 抗体との染色性を比較すると、必ずしも一致した染

色態度を示すものではなかった。認識する PrP の局在の差が、どのような意味を持つのか、今後 CJD 症例について詳しく検討する必要がある。

また、作製された sPrP に対する MAb を用いた ELISA 法による検出系の検討では、sPrP の検出可能な MAb が得られた。sPrP に対する抗体のみならず Mal - PrP に対する抗体にも反応性がみられた。

これらの抗体がどのようなエピトープを有するのか、あるいは検出感度・特異性の検討、さらに CJD 患者体液などの臨床材料との反応性などについての検討が今後残されている。

【参考文献】

- 1) 田中智之、北元憲利、村本環、北本哲之、毛利資郎、辻力、吉田宗平、藤井秀治：ヒト型プリオン蛋白特異的モノクローナル抗体 # 4 1 および # 7 1 の解析と CJD における同抗体反応プリオン蛋白の局在。厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班平成 11 年度研究報告書。122-129、1999
- 2) Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T: Analyses of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. *Neuroscience Letters*. 288: 179-182, 2000.

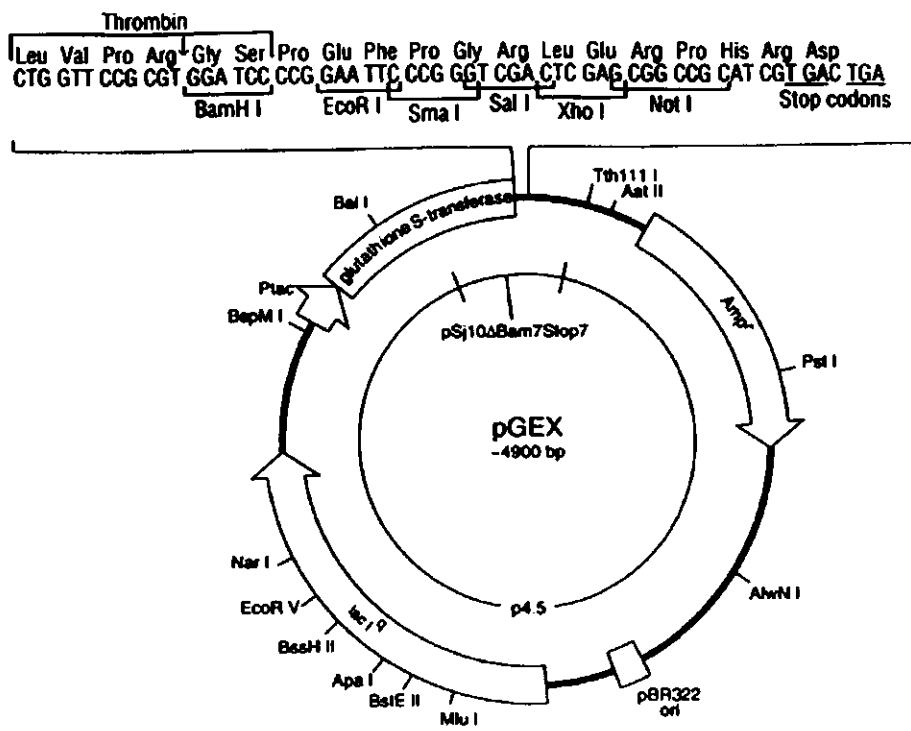


Figure 1. A scheme of the pGEX expression vector for GST-PrP peptide fusions.

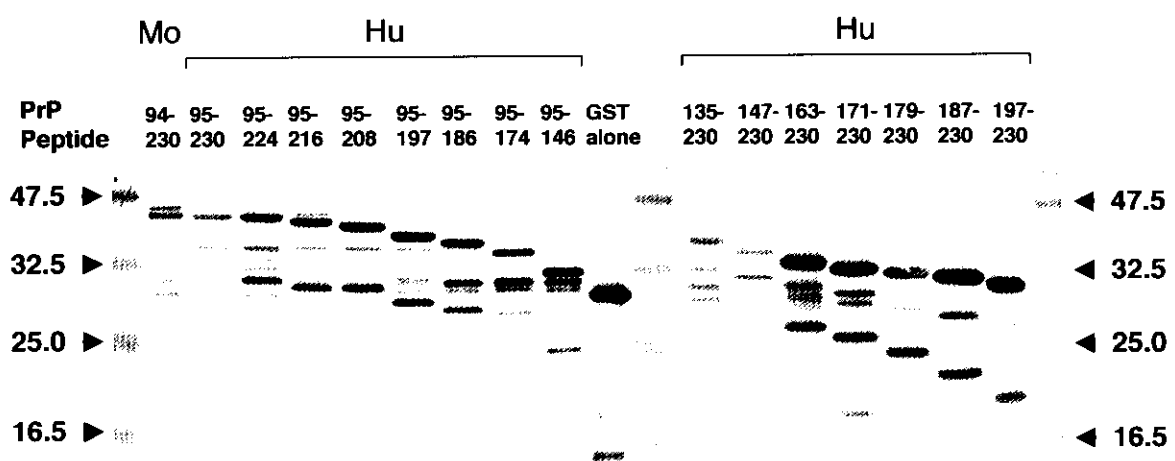


Figure 2. Expression of GST-PrP peptide fusions in *E. coli*. A Western blot with anti-GST polyclonal (Sigma). The antibody was used at a 1:1000 dilution. Color was developed by alkaline-phosphatase/NBT/BCIP system. Mo: mouse PrP peptides. Hu: human PrP peptides. PrP residues fused to GST are shown at the top of each lane.

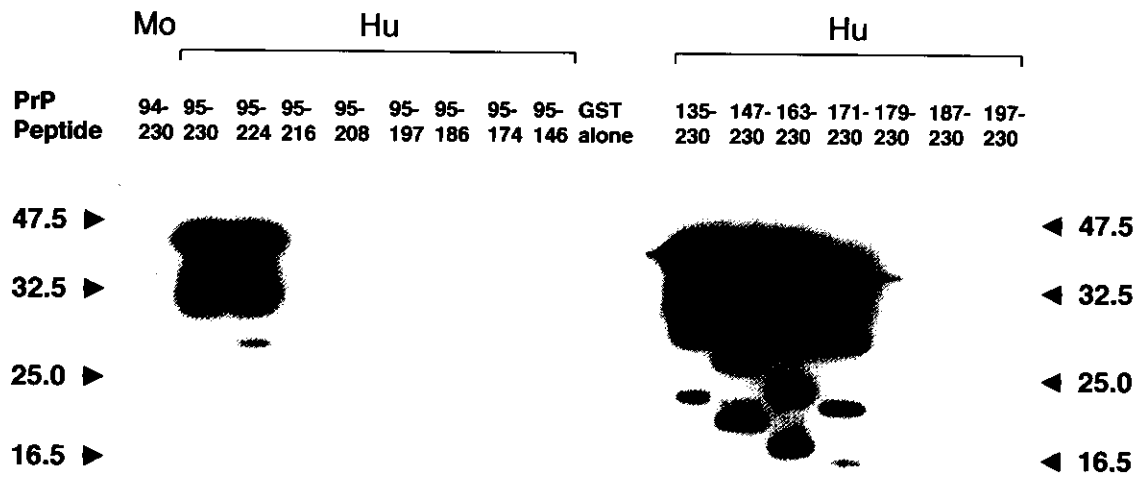


Figure 3. Immunoreactions of the #71 monoclonal antibody against GST-PrP peptide fusions (Western blot). Color was developed by peroxidase/ECL system.

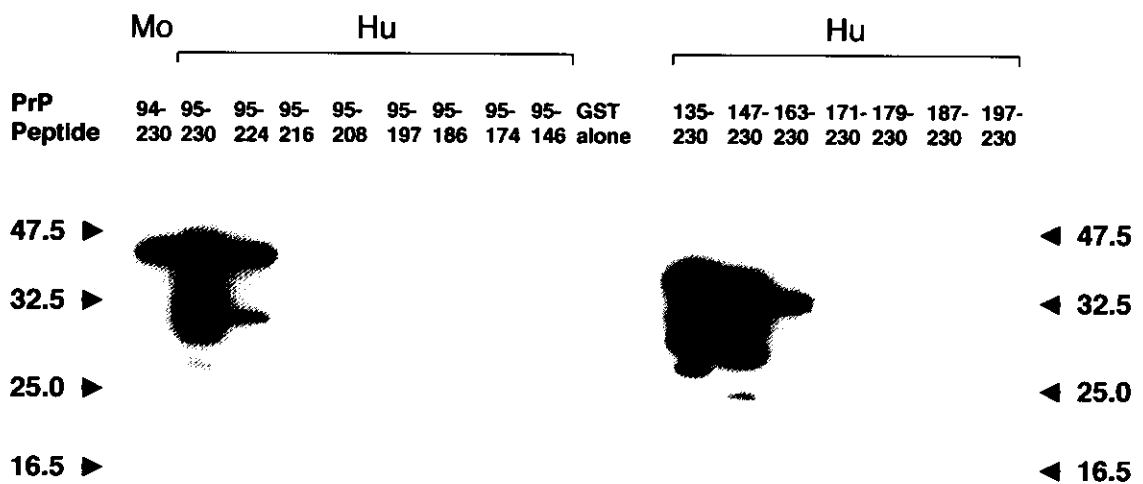


Figure 4. Immunoreactions of the #9 monoclonal antibody against GST-PrP peptide fusions (Western blot). Color was developed by peroxidase/ECL system.