

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

実験動物を用いたプリオンバイオアッセイ法に関する研究

分担研究者：毛利資郎（九州大・大学院・実験動物学）

研究要旨

1) 過剰発現によりヒト・プリオンに対する感受性向上を目指したノックインマウスの開発

ヒト・プリオンのバイオアッセイに用いる遺伝子改変マウスは、プリオン複製の仮説からすると、正常なヒト・プリオン蛋白質を過剰に発現する方が有利であると考えられる。実際にハムスターやマウス型のプリオン蛋白質発現系マウスでは過剰発現による高感受性マウスの系統が樹立されている。我々は、ヒト・プリオンに対するバイオアッセイ系の確立を目指しているが、ヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白質（キメラ型）を発現する遺伝子改変マウスが、ヒト・プリオンに対して高い感受性を示したにも関わらず、過剰発現になると抵抗性を示すことを明らかにした。本年はC末端までヒト型プリオン蛋白質（全ヒト型）を発現するマウスについて検討した。その結果、全ヒト型マウスでは発現量が高くなるにつれて感受性が高くなることが判明した。さらに、ノックインマウスではキメラ型も全ヒト型も脾臓、リンパ節に極初期に異常プリオン蛋白質の沈着が起こることが明らかになった。

このことは全ヒト型プリオン蛋白質遺伝子の過剰発現系マウスの改良、作製により、ヒト・プリオンに対してバイオアッセイの感度が上がることを示唆している。

2) ウスの脳の End-point titration assay

ヒト・プリオンの感染実験を行う際の感染価基準を作製するために高感受性マウスを用いて発病マウスの段階希釈（ $10^{-1} \sim 10^{-8}$ ）により ID_{50} の測定を行った。その結果、ヒト・プリオン高感受性ノックインマウス（Ki-ChW）の脳重量 1g あたりの LogID_{50} は 8.16 であった。これにより、今後行われる同マウスを用いたバイオアッセイでは、接種材料の力価が明確になり定量的比較が可能となった。

A. 研究目的

ヒトおよびウシなどの動物からその臓器を利用した医薬品、食品の使用が不可欠なわれわれの社会において、感染性痴呆であるプリオン病の脅威は 21 世紀の人類にとって重要な問題である。特に、医薬原材料として用いられた硬膜による医原性のプリオン病、英国で発生しヒトへの伝播が濃厚な牛海綿状脳症（BSE）いわゆる「狂牛病」の汚染国となった我が国では、ヒトならびに動物由来プリオ

ンの安全性について確実に高感度に検査できる方法の開発が急務である。われわれは従来より、プリオンの感染性に的を絞り、バイオアッセイ法の開発に取り組んできた。

そして、ヒト/マウス・キメラ型遺伝子産物を発現するトランスジェニックマウス（以下 Tg マウスと略）がヒト・プリオンに高感受性を示すことを明らかにした。これにより、今まで普通のマウスでは 600 日以上を要したバイオアッセイを 150 日にまで短縮した。

さらに、このヒト/マウス・キメラ型遺伝子の相同組換えによるノックインマウスでは脾臓の濾胞樹状細胞 (FDC) に極初期から異常なプリオン蛋白質が沈着することが判明した。これはさらにバイオアッセイを驚異的に短縮するものであった。しかしながら、このマウスは発現量が多くなると脳における感受性が低くなる、すなわち、ヒト・プリオン接種後の潜伏期間が長くなることが判明した。このマウスでの過剰発現による感受性向上は望めないと考えられた。一方、プリオンタンパク遺伝子C末端もヒト型の導入遺伝子を持つノックインマウスでの感受性を調べ、脳内接種では感受が極端に低い、FDC では明らかに異常プリオン蛋白質の沈着が認められることを明らかにした。今回は、この全ヒト型プリオン蛋白質遺伝子産物を発現する Ki マウス (Ki-HuM) について同じ導入遺伝子構造を有する Tg マウス (Tg-HuM) と交配し、ダブル遺伝子導入マウスを用いて主に過剰発現による感受性について調べた。

また、今後のこのヒト/マウス・キメラ型遺伝子ノックインマウス (Ki-ChM) における感染力価の基準を作るために潜伏期との相関を検討した。

B. 研究方法

1) 過剰発現によりヒト・プリオンに対する感受性向上を目指したノックインマウスの開発

マウス：ヒト/マウス・キメラ型プリオン蛋白質を産生するヒト/マウス・キメラ型遺伝子ノックインマウス (knock-in human/mouse

chimera PrP, codon 129 Met, Ki-ChM と略)、ヒト型プリオン蛋白質を産生する全ヒト型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウス (knock-in human chimera PrP, codon 129 Met, Ki-HuM と略)、Ki-HuM と同じ導入遺伝子を持つ遺伝子導入マウス (Tg-HuM)、Tg-HuM と Ki-HuM との交配により作出された Tg-HuM・Ki-HuM を用いた。なお、全てのマウスは導入遺伝子をホモにする、あるいは PrP ノックアウトマウスと交配して野生型のマウスプリオン蛋白質が発現がないことを確認した。また、プリオン蛋白質遺伝子産物である正常プリオン蛋白質の発現量についてはウェスタンブロットにより、半定量的に調べた。

接種：感受性試験はヒト孤発例クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者脳乳剤を脳内接種 (IC) 20 μ l, 腹腔内接種 (IP) 50 μ l を接種した。

潜伏期間：接種日を 0 日とし、反応遅延、運動失調、削瘦、無動などの臨床症状を呈し安楽死させる日までを潜伏期間とした。

確定診断：確定診断のため、安楽死させたマウスは全てホルマリンに固定後、実験室内汚染防止のため蟻酸処理を行い、常法によりパラフィン切片を作製、HE 染色と免疫組織染色を行った。免疫組織染色は hydrolytic autoclaving 法による前処理の後、一次抗体として抗 N 末合成ペプチドウサギ血清もしくはモノクローナル抗体 3F4 を用いた。

2) マウスの脳の End-point titration assay

ヒト孤発例 CJD 患者由来のプリオンを Ki-ChM 接種後、発症したマウス脳の段階希釈乳剤 ($10^{-1} \sim 10^{-8}$) を作製し、Ki-ChM マ

ウスに脳内接種し、潜伏期間と発症率を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての繁殖、感染実験は九州大学大学院医学研究院動物実験指針に従い、実験計画は九州大学大学院医学研究院動物実験委員会の審査を受け承認されている。

動物の苦痛排除・軽減のための具体的方策として接種はエーテル麻酔下で行い、発症した動物に関しては終末期に至る前にエーテル麻酔下で断首により安楽死させた。

C. 研究結果

1) Ki-ChM の潜伏期間が平均 151 日であるのに対して、同じノックインマウスの Ki-HuM は平均 624 日を要した。過剰発現系トランスジェニックマウスの Tg-HuM は平均 181 日と短縮された。また、Tg-HuM と Ki-HuM を交配して作出した Tg-HuM・Ki-HuM については平均 168 日とさらに短縮された。導入されたプリオン蛋白遺伝子の産物である正常プリオン蛋白の発現量は Ki-ChM、Ki-HuM を 1 とすると、Tg-HuM がおよそ 4 倍量、Tg-HuM・Ki-HuM は 5 倍量の発現が認められた。したがって、発現量が多くなるにつれて、潜伏期間が短縮することが判明した (Table 1)。

また、Ki-ChM と同様、Ki-HuM にも脾臓やリンパ節に異常プリオン蛋白の沈着が認められた。そして、IP 後、29 日で既に全例 (n=4) の脾臓に異常プリオン蛋白の沈着を認めた。

2) Ki-ChM の発症脳における 1g あたりの

LogID₅₀ は 8.16 であった (Table 2)。潜伏期間と感染価をプロットして近似直線を引くことによって潜伏期間と感染価の関係が得られた。

D. 考察

1) 遺伝子改変マウスを用いたヒト・プリオンに対する感受性はヒト/マウス・キメラ型プリオン蛋白遺伝子導入マウスが感受性に優れており、ORF の C 末まで全てヒト型でのマウスの感受性は低いと報告されている。しかしながら、マウスや、ハムスターの過剰発現系では高感受性であることが判っている。キメラ型の Ki-ChM の潜伏期間が 151 日であるのに対して、われわれの Ki-HuM は 624 日と非常に延長した。しかしながら、過剰発現 (4 倍) の Tg-HuM では 181 日と短くなり、Tg-HuM・Ki-HuM (5 倍発現) では 168 日とさらに短縮された。このことは C 末までヒト型にすると脳では PrP^C から PrP^{Sc} へのコンバージョンの効率が悪いものの、抑制的には働かないことを示すもので、C 末の機能に興味を持たれる。これまで、キメラでは過剰発現が感受性を抑制することから過剰発現による感受性の向上は望めなかったが、全ヒト型では過剰発現による感受性改善の可能性が考えられる。

他方、脾臓においては Ki-HuM も Ki-ChM と同様に接種後、極初期に異常プリオン蛋白の検出が可能であった。今後は脾臓における PrP^C から PrP^{Sc} へのコンバージョンに関して感受性試験により検討を行い、より早くより高感度のバイオアッセイに向けて改良を

行う予定である。

2) ヒト・プリオン高感受性ノックインマウス (Ki-ChW) の脳重量 1g あたりの LogID₅₀ は 8.16 であった。これをプロットした近似直線から、今後の、同マウスを用いたバイオアッセイでは、潜伏期間のみで接種材料の力価が推定できるようになり、定量的比較が可能となった。

E. 結論

1. C 末端まで全てヒト型の遺伝子改変マウスは過剰発現により感受性が向上することが判明した。

2. ノックインマウスではキメラ型、全ヒト型どちらもヒト・プリオン接種後極早期に脾臓において異常プリオン蛋白が沈着することが明らかとなった。

3. このノックインマウスの脾臓におけるプリオンの検出法は期間、感度共にヒト・プリオンに対する画期的バイオアッセイ法であると考えられる。

4. ノックインマウス Ki-ChM 脳を用いたバイオアッセイで判定量的試験が可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tateishi J., Kitamoto T., Mohri S., Satoh S., Sato T., Shepherd A. and Macnaughton M R.: Scrapie Removal using Planova Virus Removal Filters.

Biologicals 29: 17-25, 2001.

2. 学会発表

毛利資郎、三好一郎、笠井憲雪、北本哲之：
ヒト・プリオンのバイオアッセイ、第 132 回
日本獣医学会学術集会ワークショップ（岩手
県、盛岡市）7, October 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国内特許ならびに PCT 国際特許出願中

発明の名称：「プリオン病感染因子のスクリーニング方法」

発明者：北本哲之、三好一郎、毛利資郎

出願日：平成 13 年 1 月 31 日

出願番号：特願 20001-024279

2. 実用新案登録

3. その他

オリックス型プリオン遺伝子を発現しているトランスジェニックマウスに関する研究

研究者 小野寺 節 東京大学農学部 応用免疫学教室

研究要旨

Tg(OrPrP+/+)Prnp0/0 マウスについては、現在東京大学及び国立感染症研究所内で繁殖中である。感染実験については、国立感染症研究所内で行なう予定であるが、東京大学内でも特殊実験棟の建設計画が進行しているので、引き続きこちらの充実も行なう予定である。この研究を行なうことにより、導入遺伝子のマウス生体に及ぼす影響についても検索する。

A. 研究目的

現在、プリオン病病原体を迅速に検出出来る系の確率が求められている。そこで、他動物よりも潜伏期間の短いシロオリックスプリオン蛋白遺伝子 (OrPrP) を導入したトランスジェニックマウスを用い、迅速な高感度検出系の確立を目的として研究を行なった。

B. 研究方法

- 1)発現ベクター (pPRDEX HT2) を用いたオリックスプリオン蛋白の発現。オリックスプリオン蛋白に反応する高感度陽性抗体の作製のため、発現ベクターを用いてオリックスプリオン蛋白の発現を試みた。P8 抗体を用い、発現ベクターに組み込まれるオリックス ORF の発現を試みた。
- 2)オリックス型プリオンマウスの繁殖。Tg(ORPrP+/+)Prnp% の genotype を持つ No.34、No.50 系統マウスと KO マウスの mating を行なった。また、当研究は、東京大学内の動物実験委員会の審査を受け、倫理的における問題は見られない。

C. 研究結果

発現ベクターにより、オリックス蛋白を発現し、P8 抗体で強い発現を見た。コントロールとして、1)空ベクターで発現されたもの 2)WT マウスの脳、3)KO マウスの脳を用いた。希釈倍率 64 倍までオリックス蛋白の発現が約 3 2 kd のバンドで確認された。さらに WT マウスの脳では、バンドが確認でき、negative コントロールの空ベクターで発現されたサンプルや KO マウスの脳ではいずれもバンドは検出されなかつた。また、Tg(OrPrP+/+)Prnp0/0 の genotype を持つ No.34、No.50 系統マウスと KO マウスの mating により、妊娠、出産が行なわれた。

D. 考察

現在、オリックス型プリオン遺伝子を持つトランスジェニックマウスにマウス型スクレイビー病原体の感染実験を行なった。その結果、

トランスジェニックマウスにおいて、潜伏期が 20 日程短縮された。同時に、免疫組織化学により、トランスジェニックマウスにおいて、脳、脾臓内により多く PrPsc の蓄積が見られた。心筋には、変性が見られたが、免疫組織化学による検出可能な蓄積は見られなかつた。しがたつて、トランスジェニックマウス病原体の検出感度を高めるのに有効と考えられる。

E. 結論

すでに感染研内に SPF 化されたトランスジェニックマウスが 100 匹以上存在するので、随時、研究用に供するのが可能と思われる

G. 論文発表

1. Kurosaki, A., Yusa, S., Nasu, Y., Nishimura, T., Nakamura, Y., Saeki, K., Natsumoto, Y., Itohara, S., and Onodera, T.: Regulation of cellular form of the prion protein expression in mouse T lymphocyte development, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:103-107, 2001.
2. Seo, S-W., Hara K., Kurosaki, A., Nasu, Y., Nishimura, T., hayashida, N., Saeki, K., Matsumoto, Y., Endo, H., and Onodera, T.: Comparative analysis of the prion protein ORF nucleotide sequences from two wild ruminants, moufflon and golden takin *Intervirolology* 44:359-363, 2001.
3. Sakudo, A., Lee, D-C., Saeki K., Nakamura Y., Inoue K., Matsumoto Y., Itohara, S., and Onodera, T.: Antioxidant defence activation by prion protein prevents free radical-mediated cell death in prion protein-deficient neuronal cell line. Submitted. 2001.

H. 知的財産 の出願

3. 特許出願

- ・ 藤森昭一、小野寺節、糸原重美：プリオンタンパク質に対するモノクローナル抗体
- ・ 糸原重美、小野寺節、藤森昭一：プリオン遺伝子を有しないマウスミエローマ細胞株

プリオン・バイオイメーキング法の開発に関する基礎研究

研究協力者 堂浦克美 九州大学大学院医学研究院脳研病理助教授

〔研究要旨〕 ヒトプリオン病の早期診断及び病勢診断のためのプリオン・バイオイメーキング法の開発をめざし、その基礎研究を行った。本年度は Congo red 関連化合物である BSB に注目し、プリオン・イメーキングプローブとしての有用性について検討した。まず、BSB が脳内に沈着した異常なプリオン蛋白を描出し得ることをヒトプリオン病の剖検脳切片を用いて確認した。次に末梢血管より BSB を投与し、脳内に沈着した異常なプリオン蛋白を描出できるかどうかをスクレイピー罹患マウスを用いて調べたところ、その効果を確認できた。以上より BSB がプリオン・バイオイメーキングのプローブとして有用であることが示唆された。しかし、微細なシナプス型の異常なプリオン蛋白沈着を描出するためには、より感度と特異性に優れた化合物を探索する必要がある。

A. 研究目的

ヒトプリオン病の早期診断及び病勢診断のための簡便で非侵襲的な新規検査法として、PET・SPECT と云った核医学的検査法による生体内の異常型プリオン蛋白描出を行うプリオン・バイオイメーキング法の開発をめざし、その基礎研究を行った。

本年度はプリオン病の標的臓器である中枢神経系への移行のよい Congo red 関連化合物である (trans,trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene (BSB) に注目し、プリオン病におけるイメーキングプローブとしての有用性について検討した。

B. 研究方法

1) 実験動物としてハムスター型プリオン蛋白を過剰発現する遺伝子改変マウス Tg7 を用い、1%263K スクレイピー株 20 μ l を脳内接種 (IC) して罹患モデルを作成した。この罹患マウスでは、IC 後 5 週頃より脳内に異常なプリオン蛋白の沈着が観察され、7 週頃に発症し、発症後は 2 - 3 日以内に死亡する。

2) IC 5 週後にマウスを安楽死させ脳の凍結切片を作成し、ヒトプリオン病 (GSS, sCJD) の剖検脳ホルマリン固定切片と共に 0.01%BSB 溶解液にて染色を行い BSB による蛍光シグナルをコンフォーカル・レーザー顕微鏡で観察した。

3) IC 6 週後に麻酔下にてマウスの尾静脈へ 0.5%BSB 溶解液を反復注入し、一定時間後 (15、18、24、36、42 時間後) に安楽死させ脳の凍結切片を作成しコンフォーカル・レーザー顕微鏡で観察した。

4) BSB シグナルを観察した切片と同一または連続する切片を hydrolytic autoclaving 前処理後に IBL 社の抗プリオン蛋白抗体 (C 末側の合成ペプチドに対する polyclonal 抗体) を用いて、異常なプリオン蛋白沈着の免疫組織化学的検索を行い、BSB による蛍光シグナル像と比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

C. 研究結果

ヒトプリオン病剖検脳切片における異常プリオン蛋白の描出

GSS 患者脳においては小脳皮質を中心に BSB による斑状の蛍光シグナルが見られた。これらの斑状構造物は、プリオン蛋白の免疫染色で確認されたクルー斑に一致していた。一方、sCJD 患者脳においては灰白質に見られる瀰漫性の微細顆粒状の異常プリオン蛋白沈着に一致する BSB の蛍光シグナルは観察されなかった。

モデル動物脳切片における異常プリオン蛋白の描出

IC 5 週後の Tg7 マウス脳切片では、脳梁、皮質下白質、側脳室周囲に観察された斑状の異常プリオン蛋白沈着に一致して BSB の蛍光シグナルが認められた。また、IC 6 週後に BSB 溶解液を末梢より投与した Tg7 マウスでは、注入後 15、18 時間では血管壁などの蛍光シグナルが強く異常プリオン蛋白沈着に一致した蛍光シグナルの識別が困難であったが、その後は血管壁などのバックグラウンド蛍光シグナルは消退していた。36、42 時間後に観察したものでは、血管壁等の背景シグナルがあまり見られず、異常プリオン蛋白沈着に一致した蛍光シグナルが明瞭に観察された。

D. 考察

BSB は脳内のアミロイド様蛋白に結合することが知られている Congo red 関連化合物であり、アルツハイマー病に代表される神経変性疾患の脳内に沈着する異常蛋白質の描出用プローブとして注目されている化合物の一つである。今回、この化合物がプリオン病において脳内に沈着した異常プリオン蛋白を描出できるかどうかについて検討した。その結果、末梢血管より投与した BSB が、発症以前において実験動物の脳内に沈着した異常なプリオン蛋白を描出し得ることが明かとなった。末梢血管より投与した BSB は血管壁等にも結合することがわかったが、投与後一日以上を経過すると血管壁の BSB は消失した。一方、異常プリオン蛋白と結合した BSB は一日以上を経過しても安定であり、異常プリオン蛋白と強く結合していることが示唆される。BSB はプリオン持続感染培養細胞を用いた実験より、異常型プリオン蛋白の産生を阻害することが分かっており、本研究の結果から異常型プリオン蛋白と結合することにより新たな異常プリオン蛋白の産生を阻害していることが示唆された。BSB は診断用プローブとしてだけでなく治療薬としても有用な可能性があり、BSB と同様な作用を持つ化合物の開発はプリオン病の治療と診断の両面に成果を期待できる。しかし、BSB では斑状の異常なプリオン蛋白沈着を容易に描出できたが、微細ないわゆるシナプス型の異常なプリオン蛋白沈着を描出することはできなかった。また、BSB は他の神経変性疾患脳で沈着する蛋白も描出し得る可能性があるため、より感度と特異

性に優れた化合物を探索する必要がある。

E. 結論

Congo red 関連化合物である BSB について、プリオン・バイオイメーキング用プローブとしての有用性を検討した結果、発症前の罹患脳においても末梢より投与した BSB により斑状あるいは粗大顆粒状の異常なプリオン蛋白の沈着を描出できることが明かとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawashima M., Suzuki S.O., Doh-ura K., Iwaki T.: α -Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol.* 99:154-160, 2000
- 2) Kawashima T., Furuta A., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T.: Ubiquitin-immunoreactive skein-like inclusions in the neostriatum are not restricted to amyotrophic lateral sclerosis, but are rather aging-related structures. *Acta Neuropathol.* 100:43-49, 2000
- 3) Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.: Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144, 2001
- 4) Kawashima T., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T.: Cognitive dysfunction in patients with amyotrophic lateral sclerosis is associated with spherical or crescent-shaped ubiquitinated intraneuronal inclusions in the parahippocampal gyrus and amygdala, but not in the neostriatum. *Acta Neuropathol.* 102:467-472, 2001

2. 学会発表

- 1) 堂浦克美：プリオン病の診断と治療－治療法開発の現状と早期診断法開発の重要性。第6回日本神経感染症研究会、2001年、札幌
- 2) 堂浦克美：ヒトプリオン病の診断と治療－現状と将来への展望。第5回日本神経ウイルス研究会、2001年、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

堂浦克美、村上郁子「病原性プリオンタンパク質生成阻害用組成物および病原性プリオン蛋白質生成阻害方法」、特許願 2001-227093、整理番号 P0406T、2001年7月

2. 実用新案登録

なし

分担研究報告書

プリオン病の高感度診断技術の開発

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨

免疫組織化学法によってプリオン病を疑われるウシサンプルから異常プリオン蛋白を迅速に検出方法を確認することを目的とし、条件を検討した。特に固定法と免疫染色の前処理が重要であることが判明した。またプリオン病患者脊髄液中の14-3-3蛋白の定量により10 ng/mLが境界となることを確認した。

A. 研究目的

プリオン病、特にBSEにおける迅速な異常プリオン蛋白の免疫組織化学法による検出法を確認することを目的とした。

またCJDの脊髄液中に異常高値を示す蛋白(14-3-3)の検出法の特異性を高め、生前早期診断系を確認することも目的とした。

B. 研究方法

- 1、ウシかんぬき部から採取されたホルマリン固定組織を再度20%ホルマリン60℃ 1時間の条件で固定した。
- 2、98%ギ酸処理を室温で1時間行った。
- 3、パラフィン包埋、薄切を行った。
- 4、薄切切片は45℃で乾燥させた。
- 5、脱パラ(脱パラ後に乾燥させると切片がはがれない)後、エタノールで完全に乾燥させた。
- 6、専用のオートクレーブを用い、塩酸中で(1 mM さらに検討中)121℃ 20分処理した。温度が下がったら出してPBS洗浄した。(固定時間が長い場合に関り、プロテイナーースK処理、

シグマ、4 μg/ml Tris-EDTA、37℃、10分を行う。終了後、PBS洗浄。通常は行わない。)

- 7、内因性ペルオキシダーゼ処理(3%過酸化水素水—メタノール、室温5分)を行いPBS洗浄を行った。
- 8、ブロッキング(10%正常ヤギ血清—PBS、室温5分)した。
- 9、1次抗体を載せ、37℃ 1時間反応させた。
- 10、PBS洗浄後、Envision+液、室温30分反応後、PBS水洗した。
- 11、HRP呈色反応(同人、DAB 40 mg/Tris 200ml, 100 μl H₂O₂)を行った。
- 12、蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで、室温1分においた。
- 13、蒸留水で洗浄後、脱水、透徹、封入した。
- 14、14-3-3蛋白ガンマ及びベータアイソタイプの融合蛋白を大腸菌にて発現させ、それぞれ精製した。
- 15、ガンマ及びベータアイソタイプ特異的なペプチドを抗原とするポリクロナール抗体の、組換え蛋白に対する特異性をウエスタンブロットによって調べた。
- 16、アイソタイプ特異性ポリクロナ

ール抗体を使用してプリオン病が疑われるヒト脳脊髄液中の14-3-3蛋白及び組換え蛋白を同時に測定し、比較定量した。

C. 研究結果

- 1、多くの場合送付された組織は固定が十分でなく後の操作に耐えることができない。20%ホルマリンを60度で処理することは不可欠であった。
- 2、薄切切片を45度で急速に乾燥させることも重要であった。
- 3、免疫染色に特に関係したのは塩酸による処理で高濃度ほど、染色性が高まることがわかった。おそらく異常プリオンの巻き戻しによるエピトープの露出に関与しているのであろう。しかし高濃度程、切片が剥離しやすくおそらく1 mMが適当と思われた。
- 4、ホルマリン固定が十分でない時は蛋白分解酵素による処理は組織を融解してしまいネガティブにはたらくことが判明した。
- 5、CJD等の脊髄液中14-3-3蛋白計測では、非プリオン病症例で10 ng/mlを超えないことを確認した。
- 6、プリオン病においては一般に15 ng/mLを超えていた。紛らわしい場合、時間を隔てたサンプル定量により、非プリオン病の場合低下することが判明した。

D. 考察

免疫組織化学的な方法はかなり、確立されていたが、迅速という点に加えられ、新たな問題が生じることが判明した。不十分な固定であり、感度の高さと、迅速の両面を満足させるためには今後、固定法の改良も必要であると考えられた。

脊髄液中14-3-3蛋白定量においてはガンマアイソタイプ量がプリオン病とよく相関するすること、その境界線は10 ng/mLであることを確認できたと考えた。

E. 結論

異常プリオンの迅速な免疫組織化学的な検出法では固定法と塩酸による処理が重要な改良点であることが判明した。プリオン病脊髄液中の14-3-3蛋白定量は早期診断法として、信頼できるテストであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的所有権の取得状況 なし

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ヒトプリオン蛋白質に結合する細胞由来タンパクの検索

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所室長

研究要旨 プリオンタンパクが生体内に感染するには細胞とプリオンタンパクが結合する可能性があり、何らかのプリオン結合タンパクが存在する可能性がある。今回、His-Tag を付けたリコンビナントプリオンタンパクをプローブにして種々の細胞株を用いて結合能を検索した。プリオンに感受性のある中枢由来の細胞株には結合能は見いだされなかったが、白血病由来の細胞株に認められた。さらに、詳細に特異的な結合の有無を確認する必要があるが、存在が確認されれば濃縮ばかりでなく除去法の開発にも応用できる可能性が有る。一方、血球由来の細胞株での PrP^{Sc} の発現を解析したところ、解析した全ての細胞株の細胞表面に発現が確認された。

A. 研究目的

マウスに馴化した nvCJD 由来のプリオン株を用いた感染実験から、マウス間での輸血による感染や発症以前のマウスからの血液でも感染する場合があることが報告された。ヒトでも輸血によって同様な感染が生じる可能性は否定できないので、血液製剤の安全性を高めるためにスクリーニングによって除外する方法の開発が急がれている。しかし、感染価が中枢神経系に比較して非常に低いことが言われており、プリオン蛋白を高感度に検出する方法の開発に困難が予想される。一方、生体内に入ったプリオンタンパクは何らかのルートを通じて中枢に達すると考えられるので、可能性として、血液中の細胞に結合して感染、又はキャリアーとして中枢にプリオンタンパクを運ぶことが推定できる。このようなプリオンが結合する因子が同定されれば、濃縮が可能になったり、或いは血液からのプリオンタンパクの除去ができる可能性がある。そこで、今年度はプリオンタンパクと

結合する因子の検索を行った。

B. 研究方法

C 末に histidine がタグとして 6 ケ付くりコンビナントプリオン蛋白を Cos7 細胞に発現させ、native な条件で可溶化し、ニッケルがコートしてある磁気ビーズを用いて精製した。ヒト由来の各種細胞株（脳腫瘍、神経芽腫、白血病細胞、リンパ腫など） 1×10^6 に精製したプリオンタンパクを添加し、4°C にて 30 分反応後洗浄した。洗浄後、FITC 標識した抗ヒスチジン抗体を反応させ、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定した。

また、血球での PrP^{Sc} の発現を検索するために血球由来の細胞株を抗プリオン抗体である 3F4 を用いて染色し、フローサイトメーターにて細胞表面での発現を解析した。

C. 研究結果

各種細胞株に精製したプリオンタンパクを添加して蛍光強度で結合能を検索したところ白血病由来の 1 つの細胞株に結合能が見いだされた。2 次抗

体のみを反応させた場合の蛍光強度に比べて明らかに蛍光強度が右へシフトし、精製したプリオンタンパクが結合していることが示された。同様に結合能を検索した他の脳腫瘍株や神経芽腫、リンパ腫、白血球株には明らかな蛍光強度のシフトは見い出せなかった。

一方、細胞表面には解析した全ての細胞株に PrP^c が発現していた。高い発現は脳腫瘍株や神経芽腫に見られたが、リンパ腫や白血病株においても細胞表面での発現が観察された。

D. 考察

古典的な CJD と nvCJD が明確に異なる点は後者ではリンパ節から異常プリオンタンパクが検出されることである。生体内に入ったプリオンタンパクは何らかのルートを通過して中枢に達するが、動物の感染実験などから血液中の細胞にも感染すると推定できる。その場合、細胞に取り込まれることが必要なのでプリオンタンパクが結合する因子が存在する可能性がある。我々はその可能性を検索するために histidine のタグ付きのリコンビナントプリオン蛋白を精製し、これをプローブにして細胞株の結合能を検索した。プリオンに高感受性を示す中枢由来細胞株には結合能が見られなかったが、白血病由来の 1 つの細胞株に結合能が認められた。ただし、この結合が非特異的である可能性があり、異なるタグ付きのリコンビナントタンパクを用いた確認が必要であるが、今回はそこまで実施できなかった。

また、血球細胞での PrP^c の発現を解析したところ、広範囲の細胞株に発現が認められ、血球系の細胞株においても発現していた。PrP^c と PrP^s とが親和性が高いとの報告があり、PrP^c の高発現は感染性を高める可能性があり、炎症性のサイト

カイン等が PrP^c の発現に与える影響についても解析している。

E. 結論

ヒトのプリオン蛋白と結合する細胞由来のタンパクを検索したところ、各種細胞株の内、白血病由来細胞株の 1 株から結合能を見いだした。今後、関与する遺伝子のクローニングを試みる予定である。

F. 健康危険情報

nvCJD 由来のマウスに馴化したプリオン株を用いた感染実験が報告された。発症したマウスからの buffy coat は非感染マウスを脳内への投与だけでなく静注によっても感染及び発症させることができることが明らかにされた。これは Lancet 誌に発表されたヒツジの輸血を介した感染の可能性を確認する結果となった。さらに、発症する前のマウスの buffy coat を静注しても感染性が示された。buffy coat 中の感染価は中枢組織に比較して非常に低い。Plasma protein therapeutics association 主催 work shop “The policies and science of prions and plasma” 2001.October 23-24.Washington,DC.

G. 研究発表

1. 論文発表

Suriki,H., Suzuki,K., Baba,Y., Hasegawa,K., Narisawa,R., Okada,y., Mizuochi,T., Kawachi,H., Shimizu,F., and Asakura,H., Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by adoptive transfer of immunocompetent cells from infected with a murine retrovirus. 2000.Clinical immunology.vol.97.33-42.

水沢左衛子、岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子、青木陽一郎、斎賀菊江、小室勝利.血漿分画製剤の

安全性をめぐる最近の動向.2001.Biomedical
perspectives.vol 10:227-232.

2.学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：マウスレ
トロウイルスを用いた異性間感染の解析。
第49回日本ウイルス学会。2001年。

H. 知的所有権の取得状況

なし

プリオン病の高感度診断技術の開発に関する研究

プリオンタンパク質の competitive assay による定量

分担研究者 西島正弘 山河芳夫（国立感染症研究所 細胞化学部）

研究要旨： プリオンタンパクの高感度検出・定量系を構築することを目的として、competitive assay によるプリオンタンパクの定量について検討した。即ち、ProteinG 磁気ビーズ上に PrP に対する抗体（P8）とその抗原ペプチド（moP8）の複合体を形成させた後、PrP 添加により遊離する moP8 を逆相系 HPLC で分離・検出して試料中の PrP の量を定量した。感染マウスの脳のミクロソーム画分を PK 処理して PrPres の量を推定したところ、5 ug の試料から約 1pmole の異常プリオンを定量することができた。

A. 研究目的

プリオンタンパクの高感度検出・定量系を構築することを目的として、competitive assay によるプリオンタンパクの定量について検討した。

B. 研究方法

〔方法〕 ProteinG 磁気ビーズ上に PrP に対するプリオン抗体（P8；マウス PrP の 92-109 ペプチドに対するウサギ IgG）とその抗原ペプチド（moP8）の複合体を形成させた後、PrP を添加することにより、moP8 を P8 から解離せしめ、遊離した moP8 を逆相系 HPLC（カラム：0.3mm x 150mm, Pepmap C18、流速：5ul/min、210nm）にて分離・検出して試料中の PrP の量を定量した。

C. 研究結果

使用抗体量を 1.5ug とした場合、最大 5pmole のペプチドが磁気ビーズに補足され、添加する PrP の濃度に依存してペプチドが遊離することが判った。PrP として rec.mPrp を用いた場合には約 1pmol (20ng) の PrP を定量することができた。一方、感染マウスの脳のミクロソーム画分を PK 処理して PrPres の量を推定したところ、5 ug の試料から約 1pmole の異常プリオンを定量することができた。

D/E 考察/ 結論

今回報告した competitive assay の感度は常用されているウエスタンブロット-ECL 検出法とほぼ同程度であった。使用するカラム径をより細くする（0.1mm）ことで 10 倍程度の高感度化は可能と思われる。より高感度化の方法として、遊離ペプチドを質量分析で検出、定量すること、あるいはハプテンとして用いるペプチドを蛍光ラベルして検出する事が考えられる。前者の方法

では、ペプチド分離のためのカラム操作が不要のためより短時間で分析できる利点があるので来年度の研究課題としたい。

F. 健康危険情報 特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表 無し

2. 学会発表

(1) 「プリオンタンパク質の competitive assay による定量」 大内史子、山河芳夫、西島正弘（国立感染症研・細胞化学部）神山恒夫（同・獣医科学部）

第74会日本生化学会大会（京都）2001. 10月

(2) 「遺伝性プリオン病 M232R 変異とプリオンタンパクの異常化」 絹見朋也¹、山河芳夫¹、萩原健一¹、金子清俊²、西島正弘¹ ¹感染研・細胞化学部 ²国立精神神経センター疾病研究部第7部

第74会日本生化学会大会（京都）2001. 10月

(3) 「マウスプリオン病発症過程における脳、脾臓への異常プリオンタンパク質の蓄積」 井上雄嗣¹、大内文字子²、神山恒夫³、岩崎拓也⁴、小野寺節⁵、西島正弘²、山河芳夫² 1.東工大（資源化学研究所）2.感染研・細胞化学部 3. 同・獣医科学部 4. 同・感染病理部 5.東大（農）

第74会日本生化学会大会（京都）2001. 10月

H. 知的財産権の出願・登録状況.

1. 特許取得 無し

2. 実用新案登録 無し

3. その他 無し

プリオン病の診断技術の開発に関する研究
-Proteinase K 処理抵抗性プリオン蛋白質の調製-
分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

プリオン蛋白質(PrP)の高感度なイムノアッセイの確立を目的とし、ヒト PrP の 142-160 残基に相当するペプチドに対するマウス・モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 3 株を樹立した。ヒト PrP の 142-160 残基のアミノ酸配列はウシ PrP の 153-171 残基と共通で、3 種類のモノクローナル抗体は組換えウシ PrP を認識することを確認した。

また、イムノアッセイに用いる PrP 標準品の確保を目的とし、ヒト正常プリオン蛋白質(PrP^C)及び蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP^{Sc})を含むグリオプラストーマ細胞株 T98G の全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)の調製を行った。対数増殖期の T98G 細胞から得た WCL では PrP の含量は低く、接触阻止がかかった高細胞密度下の細胞及び血清非存在下で対数増殖期から G1 期に誘導した細胞から得た WCL では PrP の含量が高かった。Proteinase K 処理(37°C, 1 時間)後に行ったイムノブロット法で、短期間の培養後に調製した WCL は酵素処理で PrP が消失したが、長期間培養後の WCL では N 末端が消化された酵素処理抵抗性の PrP^{Sc}を示した。以上の結果から、T98G 細胞は G1 期に PrP^Cを高発現し、長期間培養すると PrP^{Sc}を産生することが示唆された。

A. 研究目的

食品、医薬品及び医療用具の安全性を確保するため、伝達性海綿状脳症の原因物質である異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の簡便・迅速な検出法の開発が望まれている。本研究ではプリオン蛋白質(PrP)の高感度なイムノアッセイの確立を目的とし、次の項目について検討した。

1. 抗プリオンペプチド・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立
2. イムノアッセイの標準品として用いる正常プリオン蛋白質(PrP^C)及び蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の調製

B. 研究方法

1. 抗プリオンペプチド・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ヒト PrP のアミノ酸配列 142-160 残基に相当するペプチドに MBS を架橋剤として BSA に結合させた免疫原(hPrP (142-160)-Cys-BSA)を調製し、BALB/c マウスを免疫後に脾細胞とマウス・ミエローマ細胞 NS-1 と細胞融合を行い、培養上清を固相抗原として hPrP (142-160)-Cys-OVA を用いた ELISA でスクリーニングした。

2. イムノブロット法

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G を培養後、全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)を調製して糖鎖切断酵素(PNGase F)で PrP^Cの糖鎖を切断し、SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜へ転写した。マウス抗ヒト・プリオンペプチド・モノクローナル抗体(6H4)を用いたイムノブロット法を行い、化学発光法で PrP^Cを検出した。また、³H]thymidine の DNA への取込みを測定し、T98G 細胞の増殖能を調べた。

3. 蛋白質分解酵素消化

T98G 細胞の WCL を 37°C で Proteinase K 消化し、6H4 及びニワトリ抗ヒト・プリオンペプチド・モノクローナル抗体(HJC 2-13)を用いたイムノブロット法で PrP の蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

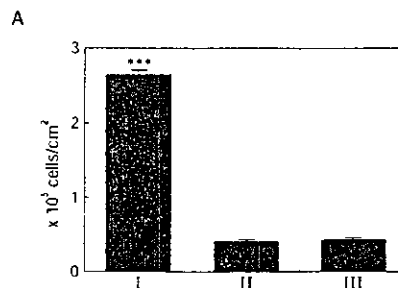
C. 研究結果

1. 抗プリオンペプチド・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ヒト PrP の 142-160 残基に相当するペプチドでマウスを免疫し、マウス・モノクローナル抗体の作製を行った。その結果、ELISA で固相抗原の抗原ペプチドを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 3 株を樹立した。抗体のクラスは、全て IgM (κ)であった。これらの抗体は、ELISA でウシ組換え PrP を認識した。

2. T98G 細胞の正常プリオン蛋白質発現機構

イムノアッセイの標準品として用いる PrP^Cの調製を目的とし、T98G 細胞を用いて PrP の発現機構を調べた。播種 16 日後の定常期の細胞(Fig. 1A-I; Fig. 1B-I)では PrP^C産生量が高く(Fig. 1C, lanes 1 and 5; Fig. 1D-I)、4 日後の対数増殖期(Fig. 1A-III;



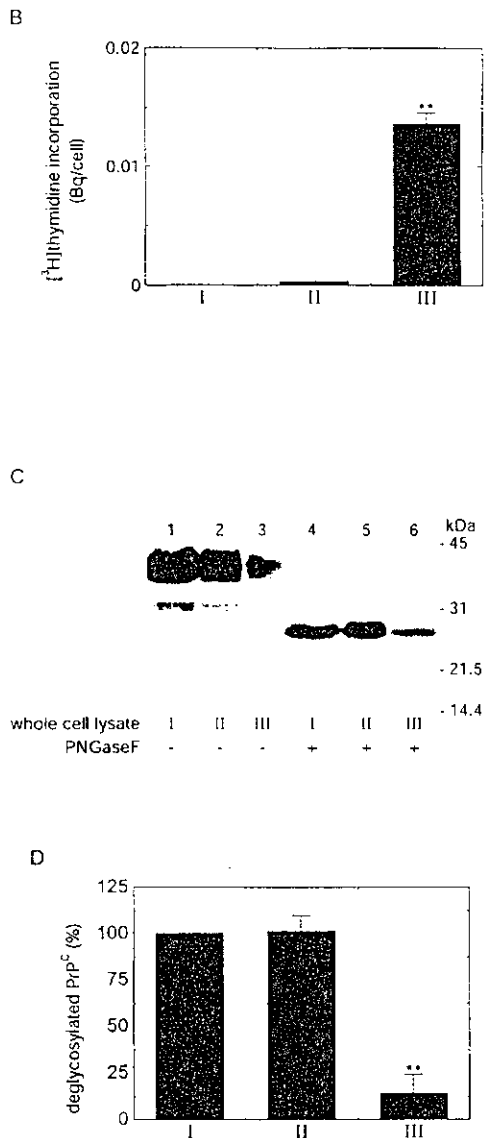


Fig. 1. High-level expression of endogenous PrP^C in quiescent T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 under the following conditions. (I) The cells were cultured for 16 days. (II) The cells were cultured for 3 days. After the medium was changed to serum-free medium containing BSA (0.1 mg/ml), the cells were incubated for another 5 days. (III) The cells were cultured for 4 days. (A) Cell-density of cultures. The cells were dissociated and counted by hemocytometer. On the panel is shown the bar of cell-density. Results are means \pm SEM from triplicate dishes. *** P < 0.001 by One-Way ANOVA. (B) Cell proliferation was determined by [³H]thymidine incorporation assay. The cultures were pulsed with [³H]thymidine for the last 6 h. Results are means \pm SEM from triplicate dishes. ** P < 0.01 by One-Way ANOVA. (C) Fifty μ g of whole cell lysate was treated with (lane 4-6) or without (lane 1-3) PNGase F. After incubation for 2h at 37°C, the lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with 6H4 antibody. (D) Densitometric quantitation of the PrP^C generated via measurement of the 25 kDa deglycosylated form. Quantitative analysis of the 25 kDa deglycosylated form of PrP^C shown in C (lanes 4, 5, and 6) was performed using computer-assisted densitometry. The integrated intensity of each bands was the percentage of the intensity on Day 16 (lane 4). Bars are means ranges from three independent experiments. ** P < 0.01 by One-Way ANOVA.

Fig. 1B-III)では産生量が低かった(Fig. 1C, lane 3 and 6; D-III)。また、対数増殖期の細胞を血清非存在下で休止期に誘導した細胞は(Fig. A1-II; Fig. 1B-II)、定常期と同程度の産生量を示した(Fig. 1C, lanes 2 and 5; Fig. 1D-II)。

3. 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質の調製

免疫アッセイの標準品として用いる PrP^{res} の調製を目的とし、T98G 細胞を用いて PrP^{res} の発現機構を調べた。細胞を長期間の継代後に播種して調製した WCL を各濃度の Proteinase K で消化後 (37°C、60 分間)、免疫ブロット法を行った。酵素未処理の WCL では、6H4 が認識する 38 kDa、31 kDa 及び 25 kDa に PrP に相当するバンドを示したが(Fig. 2A, lane 4)、Proteinase K 10 μ g/ml で処理した WCL では 38 kDa のバンドが消失して 31 kDa のバンドが増大した(Fig. 2A, lane 3)。また、細胞を短期間の継代後に播種して調製した WCL を Proteinase K で消化後に行った免疫ブロット法は、酵素未処理では 6H4 が認識する PrP に相当するバンドを示したが(Fig. 2B, lane 4)、酵素処理で全ての PrP が消化された。

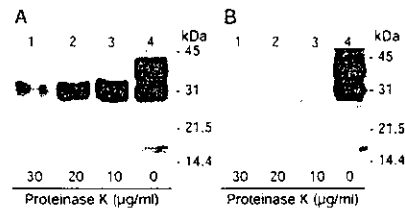


Fig. 2. PrP in long term-incubated T98G cells are partially Proteinase K resistant. Fifty μ g of whole cell lysates were treated with Proteinase K. After incubation for 60 min at 37°C, the lysates were subjected to immunoblot with 6H4 antibody as described. The lysates were prepared from T98G cells at relatively high- (A) or low- (B) population doubling level.

D. 考察

食品、医薬品及び医療用具等の PrP^{Sc} の汚染を防ぐために、高感度な PrP の検出法を確立する必要がある。平成 12 年度に抗プリオンペプチド抗体と酵素標識ペプチドを用いた新たな EIA を報告した。今年度は EIA に用いる抗プリオン抗体の調製、PrP 標準品として用いる PrP^C 及び PrP^{res} の調製を行った。

樹立したハイブリドーマが産生するマウス抗プリオンペプチド抗体は、ELISA でヒト・プリオンペプチドとウシ組換え PrP を認識した。免疫原として用いた hPrP (142-160) のアミノ酸配列はウシ PrP の 153-171 残基と共通で、3 種類のモノクローナル抗体はヒト及びウシの PrP の EIA に利用可能と考えられる。マウス PrP の 142-160 残基をエピトープとして認識する抗体(1A8, SAF61)が細胞表面の PrP を架橋し、Fyn を活性化すると報告が

ある(Science 289: 1925-1928 (2000))。今回作製したモノクローナル抗体はマウス PrP のエピトープに相当するヒト及びウシ PrP のアミノ配列を認識することから、PrP の Fyn を介した情報伝達系への関与を調べる研究にも利用可能と考えられる。

ヒト・グリオーマ細胞株 T98G の WCL に、イムノブロット法で PrP^Cを検出した。PrP^Cは対数増殖期では産生量が低く、定常期では増加した。また、対数増殖期の細胞を血清非存在下で休止期に誘導すると PrP 産生量が増えることから、PrP の発現は G1 期に増大すると推定した。

長期間の継代後に播種した T98G 細胞は、Proteinase K 消化に抵抗性の PrP^{Res} を産生した。T98G 細胞が産生した PrP^{Res} は 20-50 µg/ml の Proteinase K 処理では消化され、10 µg/ml の Proteinase K に抵抗性を示した。一方、短期間の継代後に播種した細胞の WCL は 60 分間の Proteinase K 処理では PrP が消化された。一般に、遺伝型 CJD の患者由来の PrP^{Sc} は 1-10 µg/ml の、散発型 CJD や BSE は 20-50 µg/ml の Proteinase K 処理に抵抗性を示す。T98G 細胞が発現した mRNA の塩基配列は、PrP 遺伝子 (AY008282) の塩基配列と一致し、現在知られている遺伝型 CJD に相当する変異はなかった。現在、ゲノム DNA の PrP 遺伝子の解析を進めている。今後は、様々な条件下で T98G 細胞の培養を行い、PrP が蛋白質分解酵素処理抵抗性を獲得する機構の解明を進める予定である。

E. 結論

平成 13 年度は、抗プリオンペプチド抗体を産生する 3 株のハイブリドーマを樹立した。また、T98G 細胞を G1 期に誘導すると PrP^C 産生量が増大すること、長期間の継代後に播種すると Proteinase K 消化に抵抗性の PrP^{Res} を産生することを見いだした。次年度は作製した抗プリオンペプチド抗体と酵素標識ペプチドを用いた EIA を構築し、T98G 細胞の WCL を標準品として測定系の評価を行う予定である。

F. 研究発表

学会発表

1. 武木田薫, 谷村顕雄, 菊池裕, 山崎壮, 高島浩介, 棚元憲一, 品川森一, 澤田純一: 抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用いた食品中のプリオンタンパク質検出法の開発 日本食品衛生学会第 82 回学術講演会、2001 年 10 月、長崎

論文

1. Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J.: Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. J. Health Sci. (in press)

G. 協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 山崎壮
国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 掛谷知志(リサーチ・レジデント)

III 研究成果の刊行に関する一覧表

- Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.
- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L-W. and Caughey, B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.*, 276: 15489-15497.
- Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)
- Tateishi J, Kitamoto T, Mohri S, Satoh S, Sato T, Shepherd A, Macnaughton MR. (2001) Scrapie removal using Planova virus removal filters. *Biologicals*. Mar;29(1):17-25.
- Yamashita M, Yamamoto T, Nishinaka K, Udaka F, Kameyama M, Kitamoto T. (2001) Severe brain atrophy in a case of thalamic variant of sporadic CJD with plaque-like PrP deposition. *Neuropathology*. Jun;21(2):138-43.
- Kawashima M., Suzuki S.O., Doh-ura K., Iwaki T. (2000) α -Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol.* 99:154-160.
- Kawashima T., Furuta A., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T.. (2000) Ubiquitin-immunoreactive skein-like inclusions in the neostriatum are not restricted to amyotrophic lateral sclerosis, but are rather aging-related structures. *Acta Neuropathol.* 100:43-49..
- Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.. (2001) Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144.
- Kawashima T., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T.. (2001) Cognitive dysfunction in patients with amyotrophic lateral sclerosis is associated with spherical or crescent-shaped ubiquitinated intraneuronal inclusions in the parahippocampal gyrus and amygdala, but not in the neostriatum. *Acta Neuropathol.* 102: 467-472.
- Suriki, H., Suzuk, K., Baba, Y., Hasegawa, K., Narisawa, R., Okada, Y., Mizuochi, T., Kawachi, H., Shimizu, F., and Asakura, H. (2000) Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by adoptive transfer of immunocompetent cells from infected with a murine retrovirus. *Clinical immunology*. 1.97: 33-42.
- Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., and Sawada, J. (2001) Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.* (in press)
- Kurosaki, A., Yusa, S., Nasu, Y., Nishimura, T., Nakamura, Y., Saeki, K., Natsumoto, Y., Itohara, S., and Onodera, T. (2001.) Regulation of cellular form of the prion protein expression in mouse T lymphocyte development, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:103-107.,
- Seeo, S-W., Hara K., Kurosaki, A., Nasu, Y., Nishimura, T., hayashida, N., Saeki, K., Matsumoto, Y., Endo, H., and Onodera, T.: (2001) Comparative analysis of the prion protein ORF nucleotide sequences from two wild ruminants, moufflon and golden takin *Intervirology* 44:359-363,
- 品川森一、堀内基広、松井高峯 (2001) プリオンの免疫学的検出法 *生活衛生* 45: 259-269.
- 池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 *食品衛生研究* 52: 33-42.
- 堀内基広 (2001) 動物のプリオン病 *ウイルス* 51: 145-150
- 水沢左衛子、岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子、青木陽一郎、斎賀菊江、小室勝利. (2001) 血漿分画製剤の安全性をめぐる最近の動向. *Biomedical perspectives*. 10: :227-232.

IV 研究成果の刊行物、別刷

20010705

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。