

伝子の変異を解析するために提供された試料から、後に剖検により特発性クロイツフェルト・ヤコブ病が確定した19例について検討した。対照として、九州大学遺伝情報実験施設で収集された健常者群の試料から51例を検討した。

遺伝子解析：C3レセプターであるCR1、CR2と、C1qレセプターであるC1qBPおよびC1qRpの蛋白質コード領域をPCR法にて増幅した。CR1についてはこれまでに遺伝子多型が報告されている領域と、C3/C4が結合する領域を増幅し、CR2、C1qBP、C1qRpについては全てのエクソンを網羅するようにプライマーをデザインした。clusterinについても、全てのエクソン領域を増幅した。PCR産物を鋳型にして、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech)によるジデオキシ法でシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)にてDNAシーケンスを解析した。CR1のexon19/22/33における一塩基多型については、それぞれBstNI、RsaI、MnIIの制限酵素で切断し、15%アクリルアミドゲルで電気泳動して、断片長多型を調べた。確認された遺伝子多型について、遺伝子型の分布を疾患群と対照群とで比較するために、カイ二乗検定を行った。

(ii) プリオン蛋白相互作用因子の探索

プリオン蛋白結合蛋白解析：正常型のマウス組換え体プリオン蛋白(121-231)を精製し、ビオチン標識したものをアビジン磁気ビーズに結合させ、プリオン蛋白アフィニティカラムを作製した。非感染細胞で正常型プリオン蛋白が発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞(N2a)と感染細胞で異常型プリオン蛋白が常時発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞(N2aSc)を使用した。発現が極微量なタンパク質でも検出できるよう、細胞は35Sメチオニン、システイン含有培地で生育させ、生合成タンパク質をアイソトープラベルした。細胞を1% Triton X-100で溶解し、密度勾配遠心法にてプリオン蛋白を含むラフト画分を分画した(1)。これらのラフト画分をプリオン蛋白アフィニティカラムと混合し、結合反応を行った。溶出は段階的に塩濃度を上昇させることによって行い(200、400、600、

800 mM NaCl)、得られた溶出液を10% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって展開し、感染と非感染細胞間での泳動パターンを比較した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行った。

C. 研究結果

(i) 特発性プリオン病の疾患感受性因子の検討

C1qRpにおいて、P559S、M662V(数字は、アミノ酸通し番号)の二つのアミノ酸置換を伴う遺伝子多型を認めた。P559S多型は、疾患群でS/S 9例(60%)、S/P 3例(20%)、P/P 3例(20%)であり、対照群でS/S 21例(45.7%)、S/P 23例(50%)、P/P 2例(4.3%)であった。両群間でカイ二乗検定を行ったところ、 $p=0.044$ で有意差を認めた。

CR1のexon19/22/33でそれぞれG3093T、A3650G、C5507G(数字は、ヌクレオチド通し番号)の多型が存在し、これらの多型は、DNAシーケンシングに加えてRFLPでも同様の結果が確認された。3つの多型には強い連鎖があり、遺伝子型は、3093G/G-3650A/A-5507C/Cを持つものと、3093G/T-3650A/G-5507C/Gを持つものと2通りであった。以上の予備研究から、代表してG3093Tの遺伝子多型の保有率の分布を調べた。疾患群でG/G 10例、G/T 9例であり、対照群でG/G 26例、G/T 25例で有意差を認めなかった。また、CR1のexon26にACGからATGへのアミノ酸置換を伴う一塩基多型が見られ、疾患群でC/C 10例、C/T 9例であり、対照群でC/C 23例、C/T 20例、T/T 6例で有意差を認めなかった。

C1qBPでは第3エクソン近傍のイントロン内に14塩基の欠失多型が観察された。欠失は疾患群において12例がホモで、7例がヘテロで持っていた。検索した51例の対照群でも同様の割合(35例がホモで、13例がヘテロ、3例が欠失なし)で多型が観察された。

Clusterin遺伝子の蛋白質コード領域にはアミノ酸置換を伴う遺伝子多型は認めなかった。CR2については、これまでに検索した範

圈内では遺伝子多型は確認できなかった。

(ii) プリオン蛋白相互作用因子の探索

細胞内環境を考慮し、pH 5.4, 6.0, 7.2の条件で結合反応を行ったが、結合が認められたのはpH 7.2の時であった。感染細胞抽出物を供した600~800 mM NaClの溶出画分で約100 kDaのバンドが認められた。一方、非感染細胞の600~800 mM NaClの溶出画分では、約220 kDaのバンドが認められ、プリオン蛋白と結合する感染・非感染細胞間で異なった分子の存在を発見した。

D. 考 察

プリオン病感染因子の経口的、あるいは血液を介した伝播・発症には、脾臓、リンパ装置など網内系が関与している。C1qもまた、補体システムの一員として腹腔内投与後のプリオン病感染因子の伝播に関与している(2)。今回確認された遺伝子多型は、レセプターの機能部位の提示に関わる領域とされており(5)、レセプターとしての機能に影響を及ぼすことでプリオン病発症に関与している可能性がある。C3レセプターであるCR1は、濾胞樹状細胞を含め網内系細胞にも発現していることが報告されている。今回の結果で存在が示されたCR1 exon19/22/33の多型は、赤血球表面に発現するCR1蛋白の量と相関があり、3093G-3650A-5507Cは高発現型(H type)、3093T-3650G-5507Gは低発現型(L type)の表現型と相関する(6)とされており、CR1ノックアウト・マウスにおけるプリオン病感染因子の腹腔内投与による伝播の抑制と同じ傾向が見られる可能性がある。しかし今回の研究で有意差を認めなかったことから、特発性ヤコブ病においては末梢組織でのプリオン病感染因子の増幅は関与していないことも考えられた。このことから、今後はH type、L type両者間で濾胞樹状細胞あるいは脳内におけるCR1の発現量を比較検討する必要がある。C1qレセプターであるC1qBPは、C1qと結合してその作用を抑制するとされており、マウスのC1qBP遺伝子は11番染色体の37.00cMの位置にある。プリオン病感染因子の脳内接種後の潜伏期間の長さとの相関が強い部分とされるマーカーは11番染色体40.31cMにあり(7)、C1qBP遺伝子はそれに近いところに存在す

る。これまでの解析でC1qBP遺伝子にイントロン部の欠失多型が見つかったが、その頻度は今回の解析では対照群と疾患群との間で有意差が見られなかった。検討した特発性症例の数が少ないことから、症例数を増やして検討する必要があるかも知れない。Clusterin遺伝子解析では、全てのエクソン中にアミノ酸置換を来たすような遺伝子多型は認めなかったが、CR2については、検索したエクソンに限られており、その範囲内ではアミノ酸置換を伴う遺伝子多型は確認できなかった。したがって、さらに検索範囲を拡大し検討する必要がある。

一方、プリオン蛋白と相互作用するタンパク質として、非感染細胞と比較して、プリオン持続感染細胞のラフトに特異的に存在する蛋白質分子1種と存在しないタンパク質分子1種の存在を明らかにした。これらの蛋白質のプリオン蛋白への結合条件を塩濃度だけではなく、細胞内環境も考慮したところ、pH 7.2の条件で結合が認められた。これは通常のプリオン蛋白は細胞膜表面にGPIアンカーを介した状態で存在しているため、膜表面の環境に近い条件で結合反応が起きると考えられる。今回得られた二つの蛋白質分子は600 mM NaClと高塩濃度で溶出されたことより、プリオン蛋白と比較的強固に結合する分子ではないかと考えられる。今後はタンパク質間の分離能を高めるために二次元電気泳動を行い、両群間で差が見られたスポットを単離同定し、その分子の特定を行う。また、感染細胞と非感染細胞間での比較や他種の感染細胞、これまでに効果の見られた薬剤の投与によるプリオン蛋白結合タンパク質分子の発現の異同を検討する。

E. 結 論

特発性プリオン病の疾患感受性因子の候補として補体系蛋白のレセプターであるCR1、CR2、C1qBP、C1qRpおよび補体抑制因子clusterinの遺伝子多型を、特発性ヤコブ病患者群と対照群において解析した。これまでに検索した中では、C1qRp遺伝子において疾患群と対照群とで有意に異なる遺伝子多型を認めしたが、CR1およびC1qBPに確認された多型については、保有率に有意差を認めなかった。一方、プリオン蛋白と相互作用するタンパク

質として、プリオン持続感染細胞のラフトに特異的に存在する約100 kDa蛋白質分子1種と存在しない約220 kDaタンパク質分子1種の存在を明らかにした。

F. 参考文献

1. Ishii T, Haga S, Yagishita S, Tateishi J: The presence of complements in amyloid plaques of Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Strömssler-Scheinker disease. *Appl Pathol* 1984, 2:370-379.
2. Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, Weyd H, Xenarios I, Zinkernagel RM, Carroll MC, Verbeek JS, Botto M, Walport MJ, Molina H, Kalinke U, Acha-Orbea H, Aguzzi A: Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* 2001, 7:488-492.
3. Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, Walport MJ, Pepys MB: Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* 2001, 7:485-487.
4. Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T: Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* 2002, 103:199-208.
5. Kim TS, Park M, Nepomuceno RR, Palmarini G, Winokur S, Cotman CA, Bengtsson U, Tenner AJ: Characterization of the murine homolog of C1qR(P): identical cellular expression pattern, chromosomal location and functional activity of the human and murine C1qR(P). *Mol Immunol* 2000, 37:377-389.
6. Xiang L, Rundles JR, Hamilton DR, Wilson JG: Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. *J Immunol* 1999, 163:4939-4945.
7. Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallinson G, Farrall M, Targonski P, Collinge J, Fisher EM: Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:6279-

6283.

8. Naslavsky, N., Shmeeda, H., Friedlander, G., Yanai, A., Futerman, A. H., Barenholz, Y. and Taraboulos, A.: Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J. Biol. Chem.* 1999, 274; 20763-20771.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki K, Doh-ura K, Ironside WJ, Iwaki T : Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* 103:199-208, 2002

2. 学会発表

Doh-ura K, et al : Intraventricular infusion of PPS: an immediately available therapy for TSEs. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Kubo I, Doh-ura K, et al : Chemicals with a quinoline ring are potent inhibitors of abnormal prion protein formation. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Ishikawa K, Doh-ura K, et al : BSB as a therapeutic and diagnostic chemical for TSEs. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Sasaki K, Doh-ura K, et al : Clusterin /apolipoprotein J is associated with accumulation of prion protein in the follicular dendritic cells. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

堂浦克美：プリオン病の治療薬剤の開発。第75回日本生化学会大会、2002年、京都

Doh-ura K, et al : Intraventricular infusion of PPS as an immediately applicable treatment for prion diseases. International Conference New

Perspectives for Prion Therapeutics, Paris, 2002

I. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

堂浦克美、久保郁子「病原性プリオンタンパク質生成阻害剤およびその使用方法」、特許願2002-265321、2002年

プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索

分担研究者 堀内基広 帯広畜産大学原虫病研究センター・獣医公衆衛生 助教授

研究要旨

プリオンの複製に関与する宿主因子の同定、およびプリオン複製機構の解明は、プリオン複製過程を標的としたプリオン病治療薬や治療法の開発に貢献する。そこで、本研究ではプリオンが増殖可能なプリオン感受性細胞とプリオンが増殖できないプリオン非感受性細胞の比較解析から、プリオン複製に関与する宿主因子の同定をすることを目的とした。マウス神経芽腫細胞N2aおよびNB41A3、筋芽細胞G8およびNOR10、肝細胞NMuLi、副腎皮質由来細胞Y1にマウスPrP遺伝子発現ベクターを導入して、マウスPrPを過発現しかつネオマイシン耐性となった細胞をクローン化した。PrP^C過発現クローンとマウススクレイピー持続感染細胞I3/I5をネオマイシン存在下で共培養し、PrP^{Sc}がI3/I5から伝達可能か否かを調べることで、各細胞株のプリオン感受性を検討した。これまでに、N2aがプリオン感受性であること、G8およびNOR10がプリオン非感受性であることを同定した。また、マウススクレイピー持続感染細胞I3/I5は培養条件の変更よりPrP^{Sc}の産生が急速に消失することを見出した。そこで、PrP^{Sc}産生を許容する培養条件と許容しない培養条件下での遺伝子発現の比較を網羅的に解析した。その結果、今後は、今回同定された遺伝子の詳細な解析と、プリオン感受性および非感受性細胞の比較解析を行う予定である。

A. 研究目的

プリオンの複製に関与する宿主因子の同定、およびプリオン複製機構の解明は、プリオン複製過程を標的としたプリオン病治療薬や治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。しかし、プリオンの複製に関与する宿主因子は、PrP遺伝子以外には殆ど明らかとなっていない。宿主内でプリオンは主に中枢神経系組織で増殖する。培養細胞においても、その性質や由来によりプリオン感受性に違いがあると考えられる。プリオン感受性および非感受性細胞を同定して、両者を詳細に比較解析することにより、プリオン複製に関与する宿主因子の発見・同定が可能になると考えられる。そこで本研究では培養細胞の実験系を確立するために、1) PrP^C過発現細胞の樹立、2) スクレイピー持続感染細胞との共培養による細胞間プリオン伝達実験系の確立を行なった。この実験系を用いて、マウス由来株化細胞のプリオン感受性について検討した。

また、I3/I5プリオン持続感染細胞は培養条件の変更によりプリオンの増殖が起こらな

くなることを見いだした。この現象は、培養条件の変化に伴い、プリオン増殖に関与する細胞側の因子が変化すると解釈可能である。そこで、これら培養条件による細胞の変化を遺伝子レベルで比較解析した。

B. 研究方法

マウス神経芽腫細胞N2aおよびNB41A3、筋芽細胞G8およびNOR10、肝細胞NMuLi、副腎皮質由来細胞Y1を実験に使用した。プリオン持続感染細胞として、マウスchandler株感染神経芽腫細胞を再クローニングしたI3/I5を使用した。

ヒトelongation factorプロモーター下流にマウスPrPORFをコードする遺伝子断片を挿入して、真核細胞発現ベクターpEF-MoPrPを構築した。pEF-MoPrPをトランスフェクトしてネオマイシン耐性細胞を選抜し、限界希釈法によりクローンを得た。PrP^Cの発現量はウエスタンブロット(WB法)で確認した。

各種細胞株のプリオン感受性を検討するために、I3/I5プリオン持続感染細胞をPrP^C過発現細胞株と共培養してネオマイシン存在下

で2週間以上連続継代した。ネオマイシン添加培地で培養することで、共培養中のI3/I5は死滅してPrP^{Sc}過発現細胞のみが生存する。細胞内PrP^{Sc}は、セルライセートをPKで消化後に、WB法により検出した。

I3/I5プリオン持続感染細胞を培地組成を変えて培養し、PrP^{Sc}の産生におよぼす影響をWB法にて解析した。PrP^{Sc}を産生する細胞株、および産生しなくなった細胞株の乳剤をICRマウスに脳内接種して、PrP^{Sc}の消失に伴う感染性の変化を調べた。

遺伝子発現の比較解析は、cDNA固相化マイクロビーズを用いた網羅的遺伝子発現解析法(MPSS)により解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会にて承認された実験指針に従って行なった。感染性を含む試料は帯広畜産大学BSL2, 3実験施設にて行なった。

C. 研究結果

I3/I5とPrP^{Sc}過発現ネオマイシン耐性細胞株を共培養して、ネオマイシン添加培地で連続継代した。N2aは共培養によりPrP^{Sc}陽性となった。この結果は、共培養によりプリオンがI3/I5からN2aに伝達され、N2aで増殖することを意味している(図1)。同様の伝達試験を他の細胞株を用いて行なったところ、NOR10、NMuLi(図1)およびG8(結果は示さず)では、PrP^{Sc}陽性とはならなかった。以上の結果は、N2a細胞はプリオン増殖を許容する、つまりプリオン感受性であるが、NOR10、NMuLiおよびG8はプリオン非感受性細胞であることを示唆している。また、共培養によりプリオンが伝達したN2aより限界希釈法によりクローンを多数回収してPrP^{Sc}陽性率を調べたところ、55-70%のクローンがPrP^{Sc}陽性であった。この結果は、プリオンがN2aでも希釈排除されない程度の効率で増殖可能であり、かつ、N2a細胞間でも伝達可能であることを示唆している。

また、I3/I5はOpti-MEM-10%FBSで維持・培養すると、PrP^{Sc}は長期に渡り維持されるが、その培地をD-MEM-4%FBSに変更すると、PrP^{Sc}の産生は急速に減少して数代の継代後にはPrP^{Sc}は検出されなくなることを見いだした(図2)。血清濃度の減少によるもの

ではなく、培地組成の変更が主な要因であることを確認した(結果は示さず)。現在、PrP^{Sc}を産生しなくなった細胞中のプリオン感染価をバイオアッセイにより測定している。また、この変化はプリオン持続感染N2a細胞では認められないことから、I3/I5細胞に特異的な現象と考えられる。

培養条件の変化によりI3/I5細胞でプリオンが増殖できなくなることから、Opti-MEM-10%FBSで培養したI3/I5(OP-I3/I5)とD-MEM-4%FBSで培養したI3/I5(DM-I3/I5)の間で遺伝子発現レベルの変化をMPSS法により解析した。その結果、現在までに、DM-I3/I5で発現が高い遺伝子のうち、MPSS解析で複数回出現したものが43断片、一回出現したものが38断片、得られている。

D. 考 察

プリオンの複製にはPrP以外にも宿主因子が関与することは明らかであるが、そのような因子の同定には至っていない。我々は、プリオン感受性細胞と非感受性細胞の比較解析から、前者に共通して存在するが、後者には共通して存在しない、あるいは発現量が少ない因子を探索することで、プリオンの複製に関与する宿主因子にせまることが可能と考え、まずプリオン感受性・非感受性細胞を識別する実験系の確立を行った。ネオマイシン耐性に形質転換した標的細胞を使用することで、プリオンの伝達効率が高い共培養法によりプリオン感受性・非感受性細胞の識別が可能となった。これまでに3種のマウス株化細胞を感受性・非感受性に区別することができた。プリオン感受性は複数の機構により規定されると考えるのが妥当であるが、このような株化細胞は、目的の宿主因子を同定するための有用な道具になると考えられる。

また、I3/I5プリオン持続感染細胞が軽微な培養条件の変更でプリオン非感受性へと変化することを発見し、両者における遺伝子発現レベルの比較解析を行った。途中経過ではあるが、81のプリオン感受性細胞で発現が高い遺伝子の断片が同定できた。そのうち80は既知遺伝子あるいは、EST解析などにより塩基配列がデータベースに登録されていた。今後、定量RT-PCRなどにより、同定された遺伝子断片の発現量がどの程度差があるのか

を解析するとともに、他の感受性・非感受性細胞との共通性を調べ、候補遺伝子を絞り込む必要がある。

E. 結 論

プリオン感受性・非感受性細胞を識別するための方法を確立して、3種のマウス株化細胞を感受性・非感受性に分類した。また、I3/I5プリオン持続感染細胞は培養条件の変更によりプリオン増殖を許容しなくなることから、プリオンの増殖を許容するI3/I5との間で、遺伝子発現の比較解析を行った。これまでに、プリオン増殖を許容するI3/I5細胞で発現が高い、計81の遺伝子断片を同定した。

F. 健康危険情報

感染性を有するプリオンを使用した実験は、BSL2およびBSL3実験施設内で行ない、汚染物は800度以上の焼却処理、あるいは、135°C30分のオートクレーブ処理により不活化した。実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9): 3421-3426, (2002).

Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K. and Sawada, J. Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Science*, 48(3): 288-291 (2002).

Ishiguro, N., Nakajima, A., Horiuchi, M. and Shinagawa, M. Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA exist in the canine genome. *Mammalian Genome* 13: 365-372 (2002).

Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N., Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in

Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 65(1): 75-81 (2003).

堀内基広 (2002) プリオンの検出技術 臨床検査 46 (12) 1545-1551.

堀内基広 (2002) プリオン蛋白質とプリオン病 栄養生理研究会報 46(1): 45-50.

2. 学会発表

狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、古岡 秀文、木村 久美子：モノクローナル抗体6H10の解析：PrP^{Sc}特異的抗体の可能性 第133回日本獣医学会学術集会（東京）2002年4月

毛利 崇、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：免疫磁性ビーズを用いたPrP^{Sc}検出法の開発 第133回日本獣医学会学術集会（東京）2002年4月

金 チャンラン、毛利 崇、狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：抗PrPモノクローナル抗体パネルの作製と抗体によるPrP^{Sc}産生阻害 第133回日本獣医学会学術集会（東京）2002年4月

堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、古岡 秀文、北村 延夫：経口ルートによるプリオンの感染成立には消化管リンパ装置の存在が必要である 第50回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002年10月

工藤 聡子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、横山 隆、梅谷 淳、松井 利生、柳谷 孝幸：免疫生化学的BSE診断技術の感度・操作性の改良 第50回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002年10月

田村 勇耕、堀内基広、古岡 秀文、石黒直隆、品川森一：尿崩症を誘発するマウス馴化スクレイピー株の分離 第50回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

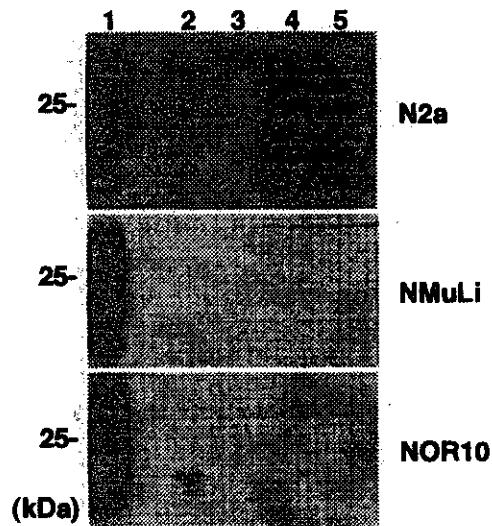
1. 特許出願

抗異常型プリオンモノクローナル抗体及び

その製造方法並びにそれを用いた異常型プリオンタンパク質の免疫測定方法
 発明者：品川森一、堀内基広、梅谷淳

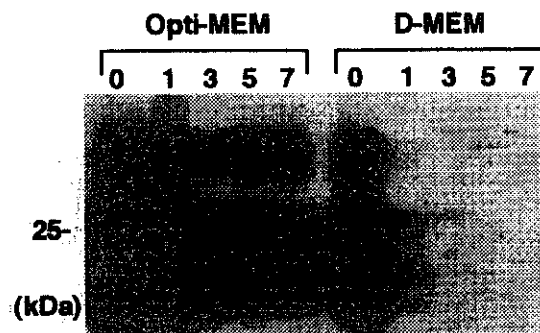
出願人：帯広畜産大学学長、富士レビオ株式会社
 特願2002-129003

図1. マウス株化細胞へのPrPScの伝達



図右に示したマウス株化細胞とI3/I5プリオン持続感染細胞をネオマイシン存在下で共培養した。8代連続継代後にセルライゼットを調整し、PK処理後にウェスタンブロットを行なった。レーン1：共培養に使用したI3/I5、レーン2,3：各々の株化細胞、レーン4,5：I3/I5と共培養を行なった株化細胞

図2. 培養条件の変化に伴うPrPScの消失



I3/I5プリオン持続感染細胞をOpti-MEMおよびD-MEMで連続継代し、1、3、5、および7代目でセルライゼットから試料を調整してウェスタンブロットを行なった。0は継代開始時のI3/I5から調整した試料。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著 者 名	論 文 標 題		
西田教行、片峰茂	プリオン病の分子機序「特集・ニューバリアントクロイツフェルトーヤコブ病」		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
化学療法の領域	18巻5号	2002	19-25

著 者 名	論 文 標 題		
片峰茂	プリオン類似分子-Doppel-121回日本医学会シンポジウム「プリオン病」記録集		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
日本医学会		2002	65-70

著 者 名	論 文 標 題		
Sasaki K, Doh-ura K, Ironside WJ, Iwaki T	Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
Acta Neuropathol	103	2002	199-208

著 者 名	論 文 標 題		
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.		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
J. Clin. Microbiol.	40(9)	2002	3421-3426

著 者 名	論 文 標 題		
Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K. Tanimura, A., Tanamoto, K. and Sawada, J.	Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting.		
雑 誌 名	巻・号	発行年	ページ
J. Health Science	48(3)	2002	288-291

著者名	論文標題		
Ishiguro, N., Nakajima, A., Horiuchi, M. and Shinagawa, M.	Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA exist in the canine genome.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
Mammalian Genome	13	2002	365-372

著者名	論文標題		
Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N., Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa, M.	Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep.		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
J. Vet. Med. Sci.	65(1)	2003	75-81

著者名	論文標題		
堀内基広	プリオン蛋白質とプリオン病		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
栄養生理研究会報	46(1)	2002	45-50

著者名	論文標題		
堀内基広	プリオンの検出技術		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
臨床検査	46(12)	2002	1545-1551

20020411

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.23-P.24の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。