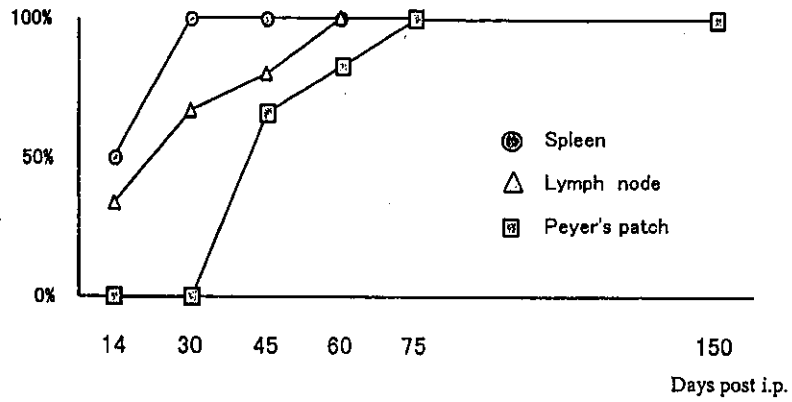


図1 Early detection of PrPSc accumulates in FDC of Ki-ChM mouse



Shirou Mohri Kyushu Univ.

表1 KiとTgに対する孤発例接種実験

Recipient mouse line	Incubation Period (ic)	Spleen	LN	Peyer	Incubation Period (ip)
KI-ChM (<i>Prnp^{ChM/ChM}</i>)	151±6.7(7/7)	(5/5)	(4/4)	(3/3)	283±9.2 (11/11)
Tg-ChM30 (<i>Prnp^{0/0}</i>)	156±14.2(11/11)	(0/8)	(0/6)	(0/4)	384±80.0 (6/6)
Tg-ChV12 (<i>Prnp^{0/0}</i>)	175±15.3(18/18)	(0/18)	(2/12)	(2/7)	>487 (5/6)
Tg-ChV21 (<i>Prnp^{0/0}</i>)	192±4.0(3/3)	(1/3)	(0/2)	(0/2)	NT
KI-ChM (<i>Prnp^{ChM/ChM}</i>)					
←KI-ChMSpleen	163±17.4 (6/6)				
←Tg-ChM30 Spleen	>403 (4/6)				

Shirou Mohri Kyushu Univ.

表2 KI-ChMを用いたマウス脳(KI-ChM)とヒト脳(H3)の希釈実験

Dilution of inoculum	マウス脳乳剤(KI-ChM)		ヒト脳乳剤(H3)	
	Days after inoculation (mean±S.D.)	Diseased /Inoculated	Days after inoculation (mean±S.D.)	Diseased /Inoculated
10-1	109 ± 1.1	(6/6)	141 ± 9.2	(7/7)
10-2	121 ± 5.1	(6/6)	153 ± 7.3	(4/4)
10-3	139 ± 7.2	(4/4)	198 ± 12.3	(5/5)
10-4	149 ± 3.1	(5/5)	>240	(4/5)
10-5	167 ± 12.4	(6/6)	>304	(2/5)
10-6	240 ± 78.2	(4/5)	>328	(0/5)
10-7	>574 ± 5.6	(4/6)	>328	(0/6)
10-8			>328	(0/6)

マウス: Log LD50/g: 8.16 ヒト: 実験途中

Shirou Mohri Kyushu Univ.

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)

平成14年度分担報告書

白オリックスプリオン遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの作成及びノックアウトマウスとの交配

分担研究者 小野寺 節

東京大学農学部応用免疫学教室の場合

研究要旨 マウスプリオン遺伝子を持たないオリックス型トランスジェニックマウスを作成した。脳、骨格筋及び心筋に遺伝子の発現が観察された。

分担研究者 小野寺節
東京大学農学部教授

イングをおこなった。さらに異常の見られたマウスについて、病理組織学的検索および、心電図の波形検査を行った。

A. 研究目的

牛型プリオン病原体について牛や羊の数千倍感受性が高いと考えられるオリックスについてプリオン遺伝子をクローニングして、遺伝子構造を決定する。この分離した遺伝子について、すでに我々の開発しているプリオン遺伝子ノックアウトマウスを用いてトランスジェニック動物を作製する。

B. 研究方法

前年得られたマウスについてノックアウトマウスと交配し、オリックス型プリオン遺伝子(o-Prnp)マウスを作製した。また、前年得られたマウスについて、臓器毎にオリックス型遺伝子のRT-PCR及びノーザンブロッテ

C. 研究結果

*o-Prnp*ホモのマウスについて、RT-PCRを行い、脳、筋肉、心臓、にオリックス遺伝子のmRNAを検出した、さらに、*Prnd*遺伝子の発現もこれらの臓器で確認した。病理組織学的には30週齢より心筋一部に変性が観察された。マウスのプリオン遺伝子を持つ *o-Prnp*ヘテロのマウスについて、スクレイピー筑波1株を用いた感染実験を行った。その結果、感染後100日頃より発症が観察された。*o-Prnp*を持たない litter mateにおいては、130日頃より発症が確認された。現在病理組織学を観察中である。

D. 考察

一般に海綿状脳症の伝達性および発症までの期間は各種のプリオン蛋白の数個のアミノ酸の違いによるという可能性が示唆されているo-Prnpはヒツジのプリオン遺伝子と1アミノ酸異なるのみで、この1アミノ酸の違いが病原体に対する感受性、及び組織病変に関与している可能性が考えられる。少なくとも我々のヘテロマウスにおいて、潜伏期の短縮が見られたことから、o-Prnpはm-Prnp(マウス型)と同様の作用をスクレイパー病原体に対して持つ事が考えられる。現在、o-Prnpホモマウスを用いてプリオン病原体の実験株の作製を計画中である。

E. 結論

他動物種よりも潜伏期の短いシロオリックスのプリオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いた迅速な高感度検出系の確立を目的として研究を行った。トランスジェニックマウス独自の感染実験も可能となった。オリックス型プリオン遺伝子マウスによる感染・潜伏期の短縮化が可能となった。コロニーの拡大を計画しなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Onodera, T.: Role of prion protein (Review). Modern Aspect of Immunobiology 1:25-35, 2000
2. Kuwahara, C., Kubosaki, A., Nishimura, T.,

Nasu, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Enhanced expression of cellular prion protein gene by insulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:763-766, 2000.

3. Hashimoto, A., Onodera, T., Ikeda, H., and Kitani, H: Isolation and characterization of fetal bovine brain cells in primary cultures. Res. Vet. Sci. 69:39-46, 2000.

4. Onodera, T., and Saeki, K.: Japanese scrapie cases (Review). Jpn. J. Inf. Dis. 53(6):56-61, 2000.

5. Kubosaki, A., Ueno, A., Matsumoto, Y., Doi, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Analysis of prion protein mRNA by in situ hybridization in brain and placenta of sheep. Biochem. Biophys. Res. Commun. 273:890-893, 2000.

6. Kubosaki, A., Yusa, S., Nasu, Y., Nishimura, T., Saeki, K., Matsumoto, Y., Itohara, S., and Onodera, T.: Regulation of cellular form of prion protein in mouse T lymphocyte development, analyzed by wild-type prion gene-deficient mice. Internatl. Immunol. (submitted), 2000.

G. 特許申請

糸原重美、局博一、小野寺節: 心臓に異常を示すプリオン遺伝子改変マウスとその使用(申請中)

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

分担研究者 堂浦克美 九州大学大学院医学研究院脳研病理助教授

研究協力者 石川謙介(九大脳研病理)、工藤幸司、澤田 徹(BF 研究所)

[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、その基礎研究を昨年度に引き続き行った。本年度は脳移行性・代謝半減期・感度・特異性において、昨年度報告した Congo red 関連化合物より優れた化合物を探索するため、76種の置換 indene 環化合物をスクリーニングした。ヒトプリオン病の剖検脳切片とスクレイピー罹患マウス脳凍結切片を用いて検討したところ、27種の化合物において粗大顆粒状の異常プリオン蛋白の沈着を特異的に描出できることを確認した。いずれの化合物も良好な脳移行性や短い代謝半減期を持つことがわかっており、臨床応用が期待できる。しかし、Congo red 関連化合物と同様にこれらの化合物も微細なシナプス型の異常プリオン蛋白沈着を描出することはできなかった。その原因を解明することと臨床応用への展開が今後の課題である。

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。昨年度の研究より、Congo red 関連化合物はプリオン病の標的臓器である中枢神経系への移行が良好とは言えない点、脳内での代謝半減期が長い点、シナプス型の異常プリオン蛋白沈着を描出できない点が問題であった。

本年度はこれらの問題点を解決するために、置換 indene 環化合物に注目して、種々の誘導体のスクリーニングを行いイメージングプローブとして有用なものを探索した。

B. 研究方法

1)スクレイピー罹患 Tg7マウス脳の凍結切片とヒトプリオン病(GSS, sCJD)の剖検脳ホルマリン固定切片をBF研究所で開発された種々の置換 indene 環化合物の1 μ mol 溶液で染色を行い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。

2)蛍光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、化合物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

GSS 脳切片における描出

76種の置換 indene 環化合物を調べたところ、27種の化合物において GSS 脳切片で小脳皮質を中心にクルー斑に一致した斑状の強い蛍光シグナルが見られた。これらの化合物の大半のものはバックグラウンドがほとんど染まらずに極めて特異的にクルー斑を描出した。

sCJD 脳切片における描出

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蛍光シグナルは、検討した76種の置換 indene 環化合物すべてで観察されなかった。

スクレイピー脳切片における描出

GSS のクルー斑を描出した置換 indene 環化合物は、Tg7 マウス凍結脳切片の脳梁、皮質下白質、側脳室周囲に観察された粗大顆粒状の異常プリオン蛋白沈着を描出した。バックグラウンドはほとんど染まらずに極めて特異的に異常プリオン蛋白を染めた。

D. 考察

置換 indene 環化合物である IBOX, [N-methyl-11C]6-Me-BTA-1などは、脳移行が良好でアルツハイマー病のβアミロイドの描出用プローブとして最近注目されている化合物である。昨年度、プリオン・バイオイメージングプローブとして Congo red 類似化合物に注目して検討を行ったが、脳移行性、代謝半減期などの点で問題があることがわかった。そこで、あらたに置換 indene 環化合物について76種の誘導体を検討したところ27種の化合物に描出用プローブとしての有効性が認められた。これらの化合物はいずれもバックグラウンドが低く、極めて特異的に異常プリオン蛋白アミロイドを描出し得ることが明らかとなった。これらの化合物は、代謝半減期が短く脳に蓄積しないこと、脳移行が極めて良好であることがわかっており、特異的に粗大顆粒状の異常プリオン蛋白を認識できることから、臨床への応用が期待される。また、これらの化合物の大半は、プリオン持続感染培養細胞を用いた実験において、異常型プリオン蛋白の産生をナノモルオーダーの低濃度で阻害することがわかっており、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することが示唆される。したがって、これらの置換 indene 環化合物は診断用プローブとしてだけでなく予防治療薬としても有用である可能性がある。しかし、昨年度の Congo red 類似化合物と同様に、置換 indene 環化合物は微細ないわゆるシナプス型の異常プリオン蛋白沈着を描出することはできなかった。このことは、蛍光検出の感度の問題であるのか、あるいはシナプス型異常プリオン蛋白には結合し得ないのか、解決すべき非常に重要な問題点であり、今後の課題である。

E. 結論

プリオン・バイオイメージング用プローブとして脳移行性、短代謝半減期、特異性などの点でより有用な化合物を探索するため、76種の置換 indene 環化合物をスクリーニングした。その結果、27種の化合物で粗大顆粒状の異常なプリオン蛋白の沈着を明瞭に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) 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

- 1) Doh-ura K, et al: Intraventricular infusion of PPS: an immediately available therapy for TSEs. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002
- 2) 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
- 3) Ishikawa K, Doh-ura K, et al: BSB as a therapeutic and diagnostic chemical for TSEs. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

H. 知的財産権の出願・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9月

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

プリオン病の診断技術の開発に関する研究

研究者 田村 守 北海道大学 電子科学研究所 教授

研究要旨

BSEの全自動多検体検査システムの構築を最終目標として、当研究室で開発された蛍光相関分光法（FCS）を抗原-抗体反応に拡張し、BSEの検査装置の実用化の基礎検討を行った。帯広畜産大学グループと共同研究の結果、我々のFCSによる一分子蛍光検出法の有効性を確認した。

A. 研究目的

北海道大学・電子科学研究所で研究・開発を行ってきた蛍光のゆらぎを利用する蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS）を抗原・抗体反応に拡張し、一個～数個の異常蛋白質の検出技術を確認する。本手法は単一分子レベルの検出感度を持ちすべての行程が液相のため、試量の増幅、あるいは分離精製を行わずに多量のサンプルの全自動スクリーニングが可能である。本研究はこのFCSによる多検体の病態検出が可能で自動化システムを構築することを目的としている。検出対象は、従来の医療診断の範囲をはるかに超える膨大なサンプル量である牛海綿状脳症（BSE）に的をしぼり、抗体検査キットと汎用BSE検査装置を実用化する。なお、本システムは抗原・抗体反応の新しい多検体、超高感度検出技術であり、他の特異抗原を用いれば多数の病態診断に応用できる。

B. 研究方法

FCSは従来の蛍光標識した抗原・抗体反応にすべて応用出来、超高感度かつ全自動化が可能である。従って現行の医療機関で要求される各種の病態診断を迅速かつ高感度で行え、特に大量の検体の診断が要求される病態スクリーニング等で威力を発揮する。更に現在最も強く望まれている生前診断の道を探るため、脳脊髄液や血液サンプルでの異常プリオン検

出の検討も行う。そこではより新しい原理に基づく相互相関FCSの導入を計る。本システムは従来の手法より2～3ケタ高い感度で特異的蛋白質を単一分子レベルで検出可能なため、微量な検体しか得られない人のプリオン病であるクロイツフェルトヤコブ病（CJD）の早期診断の可能性も探る。

C. 研究結果

電子科学研究所と帯広畜産大学の両グループは後者が作製したBSE抗体に蛍光ラベルし、プリオン蛋白との抗原-抗体反応を前者の装置で計測を行い、抗原（プリオン蛋白質）の液相での直接検出が可能であることを確認した。更に、蛍光ラベルの改良点、抗体の力価等についても予備的検討を行った。これらの結果より本提案による実用化が可能であると結論した。一方研究用FCS装置はすでにオリンパス光学が試作を開始し、その性能評価を電子研が行い、市販されようとしている。ここでつちかった技術を更に改良し、BSE検査に特化したシステムを構築する。これに必要な多チャンネル装置は浜松ホトニクスにより光学系及び検出系を含めた装置が試作されており、我々は最終的に両者の技術を合わせサンプルチェンジャーを装備したシステムを組みあげる。

D. 考察

抗原-抗体反応に基づく病態診断において、検出対象である特定の蛋白質に

対する抗体を色素でラベルし2次抗体を用いて分離し、蛍光あるいは吸収を測定して求めるのが一般的である。この時の感度は蛍光抗体の検出感度で決まる。本システムで用いるFCSは蛍光分子を単一分子レベルで検出でき、しかも分子量変化を鋭敏に反映する。抗原と反応した抗体の分子量は二次抗体と結合し大きく変わるため、分離することなく反応液中で検出可能である。更に計測し得る体積はフェムトリットル (10^{-15} l) 以下のため、検体は 1μ l もあれば十分である。従ってFCSを用いることにより、微量検体 (1ドロップ以下) を高感度かつ液相で抗原・抗体反応を追跡できるため、全自動多検体の測定が可能となる。FCSは本邦において当研究室のみで開発が行われ抗体検出や全自動化もすべて我々が最初である。

本システムの中心技術であるFCSは従来の光強度を測る手法と異なり、蛍光ゆらぎを利用する新しい手法であり、その特徴は蛍光分子一個の検出が可能にある点にある。この技術を遺伝子診断や蛋白質-蛋白質相互作用への検出へ初めて応用し、汎用装置として製品化されようとしている。帯広畜産大の持つBSE診断技術と我々のFCS検出技術の融合はBSE診断の全自動化を可能にする。

E. 結論

我々は散乱系の分子ゆらぎを利用した相関分光法を開拓してきた。蛍光相関分光法 (FCS) はこの分子ゆらぎを利用した単一分子検出が可能で新しい手法である。本手法はサンプル量が微量 (μ l以下) でかつ一個の分子の検出が可能で新しい超高感度蛍光測定法として多大な興味を持たれている。今回の提案である抗原-抗体反応のFCS計測の基本原理は蛋白質-蛋白質相互作用を本手法を用いていかに液相で単一分子レベルで追跡し検出し得るかであり、すでにシャペロニンやBSE抗体を用いてその実現性を実証した。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Tamura, Y. Hoshi, M. Nemoto, C. Sato, S. Kori

“Quantitative Optical Imaging of Brain Activity – Human and Animal Studies”
International Congress Series, 1235, 181-188(2002)

S. Kohri, Y. Hoshi, M. Tamura, C. Kato, Y. Kuge and N. Tamaki

“Quantitative Evaluation of the Relative Contribution Ratio of Cerebral Tissue to Near-infrared Signals in the Adult Human Head: a Preliminary Study”
Physiological Measurement, 23, 301-312, (2002)

C. Sato, M. Nemoto and M. Tamura

“Reassessment of Activity-Related Optical Signals in Somatosensory Cortex by an Algorithm with Wavelength-Dependent Path Length”
Japanese Journal of Physiology, 52, 304-312, (2002)

T. Muto, K. Saito, M. Tamura and M. Kinjo

“Microenvironment analysis in squid axons using fluorescence correlation spectroscopy and laser scanning microscopy”
Acta Histochem. Sytochem, 35(2), 87-91, (2002)

Y. Kakihara, A. Matsunaga, K. Tobo, S. Isowaki, M. Kawakami, I. Tsuneyoshi, Y. Kanmura, and M. tamura

“Redox behavior of cytochrome oxidase and neurological prognosis in 66 patients who underwent thoracic aortic surgery”
European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 21, 434-439 (2002)

K. Yumino, I. Kawakami, M. Tamura, T. Hayashi, and M. Nakamura

“Paraquat-and Diquat-Induced Oxygen Radical Generation and Lipid Peroxidation in Rat Brain Microsomes”
Journal of Biochemical, 131, 565-570 (2002)

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

プリオン病を臨床診断するために、脊髄液試料中の 14-3-3 蛋白の定量系を開発した。ウエスタンブロットによる比較定量により、ガンマアイソタイプがプリオン病において最も境界鮮明に上昇しており、非プリオン病においては 15 ng/mL を超えて上昇することは極めてまれであることが判明した。ただし CJD の中に脳萎縮が少なく正常値を示すタイプがまれにある。また脳挫傷等で一過性に上昇する場合は時間を隔てて定量を行うと正常値に戻っていることが判明した。

ヒト、ウシ、カニクイザルのプリオン発現トランスジェニックマウスを作成しバイオアッセイ、異常プリオンの大量発現、モノクロナール抗体作成による診断技術の高感度化を最終目的としてそれぞれの遺伝子クローニングを行った。シーケンス、培養細胞での発現を確認した。

A. 研究目的

プリオン病を臨床診断するために、脊髄液試料中の 14-3-3 蛋白の定量系を開発を目的とした。またプリオン病における迅速、高感度なアッセイ系確立のためにトランスジェニック作成を目標とした。

B. 研究方法

- 1、脳挫傷後、4日目を含む脊髄液試料中の14-3-3ガンマ蛋白を定量した。
- 2、ヒト、ウシ（和牛、ホルスタイン）、カニクイザルの保存臓器からDNAを抽出した。
- 3、PCRにより増幅し、クローニングベクターへトランスファーした。
- 4、シーケンスを決定した。
- 5、データベースのシーケンスと比較した。
- 6、哺乳類での発現ベクターへcDNAをトランスファーした。
- 7、293T細胞へトランスフェクトしウエスタンブロットによって発現を調べた。

- 8、ウシの遺伝子に関しては3分割しそれぞれGSTとの融合蛋白として発現させた。

C. 研究結果

- 1、脊髄液中 14-3-3 ガンマ蛋白は脳挫傷後 4 日目では 700 ng/ml を超えていたが、1 ヶ月で正常値 (15 ng/ml) へ戻った。
- 2、ウシについては 4 つある疎水性領域のうち 4 番目の領域にある 218 及び 222 番目のアミノ酸がそれぞれ E, R(1995 年)または K, E (1992 年) のシーケンスが報告されているが、和牛、ホルスタイン共に E, E を示した。
- 3、カニクイザルはヒトのアミノ酸配列との比較において 9 箇所異なっていた。報告されているアミノ酸シーケンスと一致していた。
- 4、293T 細胞での発現はウエスタンブロットによって確認できた。

5、ウシプリオンペプチドと GST の融合蛋白の発現が確認された。

D. 考察

プリオン病を臨床診断するために、脊髄液試料中の 14-3-3 蛋白の定量系を開発した。ウエスタンブロットによる比較定量により、ガンマアイソタイプがプリオン病において最も境界鮮明に上昇しており、非プリオン病においては 15 ng/mL を超えて上昇することは極めてまれであることが判明した。ただし CJD の中に脳萎縮が少なく正常値を示すタイプがまれにあることも判明した。また脳挫傷等で一過性に上昇する場合は時間を隔てて定量を行うと正常値に戻っていることが判明した。

プリオン蛋白の免疫組織化学的な方法はかなり、確立されてきたが、病原性を含めて調べるといふ点でトランスジェニックマウスを使用したバイオアッセイは有用である。クローニング後、発現を確認したヒト、ウシ、カニクイザルの遺伝子を使用したトランスジェニックマウスの開発は迅速なバイオアッセイ、病原体の供給、病態解析という点で今後有用になると考えられる。ウシの第 4 疎水性領域

に認められたアミノ酸の組み合わせはこの領域にウシで多型が多く生じていることを示唆した。

E. 結論

脊髄液中 14-3-3 蛋白定量はプリオン病において 15 ng/ml を超えていることが判明した。ただし脳萎縮の少ない例の検出はできない。また一過性に高値をとる場合があるが時間を隔てると正常値に回復することが判明した。バイオアッセイのためのトランスジェニック作成とモノクローナル抗体作成のための遺伝子クローニングと発現ベクターの作成が終了した。

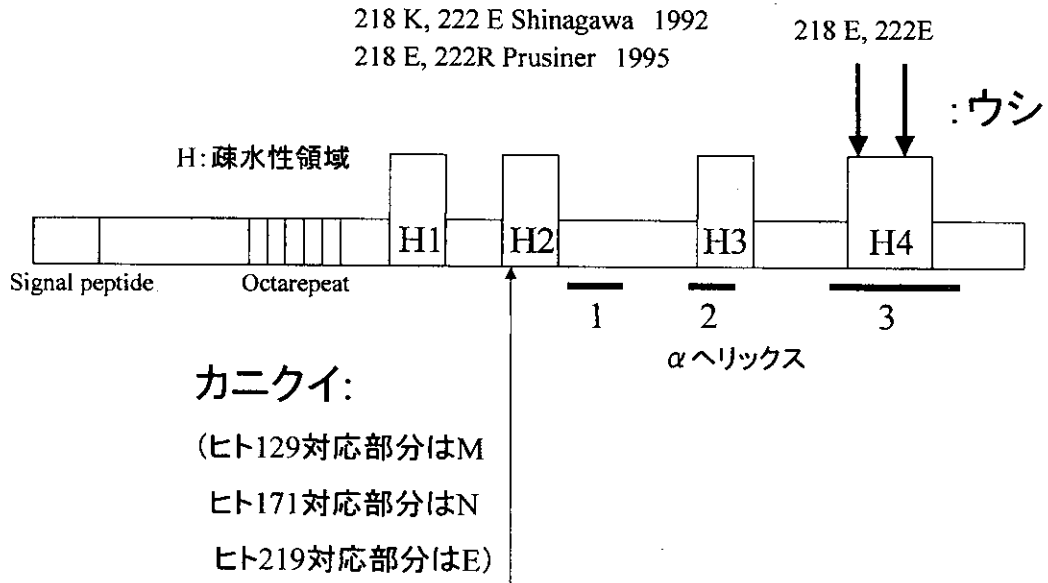
F. 研究発表

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

図 1

報告されているアミノ酸シーケンスとの比較



研究要旨 血液中に存在する正常プリオンタンパク(以下 PrP^c)を検出するために、白血病細胞株を用いて、プリオンタンパク質を認識する抗体をコーティングした磁気ビーズ、及びポリエチレングリコールを用いて濃縮後、ウエスタンブロット法で検出を試みた。用いた白血病細胞株は神経系由来の細胞株に比べて PrP^c の発現が弱く、細胞表面に存在する量も非常に少なかったが濃縮・検出が可能であった。培養液中に存在する可溶性 PrP^c も細胞の発現量に依存した。一方、体内に侵入してきたプリオンを運ぶベクターが明らかになれば、血液中からの検出・除去が可能と考え、神経系と免疫系とを繋ぐ因子を検索したところ、SDF-CXCR4系の可能性が示唆された。

A. 研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤の安全性をさらに高めるため、これらの製剤にプリオン病の感染因子が混入しないようにすることが大切である。スクリーニング検査によって除外する方法の開発が急がれているが、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って中枢に達すると考えられるので、可能性として、神経系と免疫系とを繋ぐ因子を検索し、血液中の細胞に結合して感染、又はキャリアとして中枢にプリオンタンパクを運ぶ細胞の存在が推定できる。このようなプリオンが結合する細胞が同定されれば、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。

B. 研究方法

脳腫瘍、神経芽腫、白血病細胞、リンパ腫などを 1×10^6 /ml の条件で 2 日培養し、細胞はウエスタンブロット法で、培養上清は SAF32 抗体または、3F4 抗体がコートしてある磁気ビーズを用いて濃縮した。磁気ビーズへの抗体のコーティングは Tosylactivated された M280 磁

気ビーズに定法にしたがった。さらに、濃縮するためにポリエチレングリコール 6000 を各々最終濃度 1、3、5、8、10 % になるように添加し、沈澱をウエスタンブロット法にて PrP^c を測定した。また、可溶性 PrP^c を増加する因子を検索するために MIP-1、LPS、IL-1beta、TNF、poly-IC 等を添加して、その上清中の PrP^c を検索した。また、フローサイトメーターにて細胞表面に発現している PrP^c の発現を解析した。また、体内に侵入したプリオンタンパクが神経系の組織まで達するためには何らかのベクターの存在が必要であろう、との仮説の元に SDF (stromal derived factor) が小脳に発現していることより、神経系細胞株での SDF 発現を RT-PCR と ELISA で検索し、SDF に対するリンパ球系細胞株の遊走性を解析した。

C. 研究結果

各種細胞株での PrP^c の発現は各々が由来する組織と関係し、神経系由来の細胞株に著明な発現が認められ、一方、血球系細胞株では非常に発現は弱く、その中では B 細胞系の株が比較的強かった。磁気ビーズを用いた培養上清からの検出では、PrP^c の量は細胞での発現量に一致して、神経系細胞株で強く、血球系の株は B 細胞株以外では検出できなかった。PEG を用いた

濃縮では 3%から 8%の濃度で PrP^{sc}を含む沈澱が得られた(fig.1)。培養上清中に存在する PrP^{sc}に与える影響を解析するために、種々の因子(炎症に関係する)を添加して解析したが、著明な変化は認められなかった。また、神経系細胞株において RT-PCR にて SDF の発現と B 細胞株の SDF への遊化性を認めた(fig.2)。

D. 考察

磁気ビーズと PEG を用いて、種々の細胞株から培養上清中に切り出される PrP^{sc}を解析したが、血球系の細胞株からは B 細胞系以外からは検出できなかった。検出できない理由として発現量が神経系の細胞に比べて著明に低いことが明かとなった。また、血球系細胞から切り出される PrP^{sc}の量に与える因子を主に炎症に関係する因子から解析したが、著明な影響を与える因子は見い出されなかった。実際に採血された血液は、抗凝固剤存在下において数時間室温に保たれた後、遠心処理等が行われることから、白血球由来の PrP^{sc}が増えないようにするために(PrP^{sc}が PrP^cと同様に切り出されると仮定した場合)温度や抗凝固剤の影響をさらに検討する必要がある。

一方、体内に侵入し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し、増殖することで個体を発症させるが、動物の感染実験などから血液中の細胞にも感染性があることが知られている。また、発症と B 細胞との関係や FDC(follicular dendritic cell)に感染初期に PrP^{sc}が検出されるなど、免疫系の細胞が PrP^{sc}を運ぶベクターの役割を担っている可能性がある。その場合、何らかの形で PrP^{sc}を持った細胞が神経系の組織に到達することが必要になる。それを説明する機序として SDF-CXCR4 は興味深いものだと言える。これを証明するために腸管組織や腹腔内神経節などでの組織学的 SDF 発現の有無を検索している。また、マウス順化 PrP^{sc}を用いた in vivo での感染実験も予定し

ている。

E. 結論

血球系由来の細胞株での PrP^{sc}の発現は神経系細胞に比べて非常に低い。そのため培養上清に存在する量も少なかった。血液の安全性向上のために PrP^{sc}の検出を末梢血で行う場合、量が非常に低いことが予想され、しかも発症前のヒトが対象なことから新しい技術を含めた診断法の開発が必要である。また、白血球除去の有効性を再評価する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべき情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子:パルボウイルス B19 の感染系の確立とその応用。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2002 年 10 月、札幌市。

H. 知的所有権の取得状況

なし

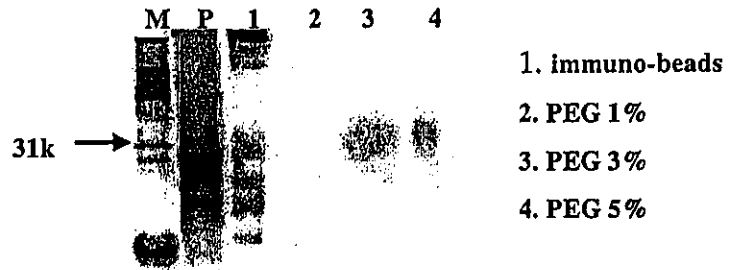


Fig.1 Concentration of PrP^c with polyethylene glycol

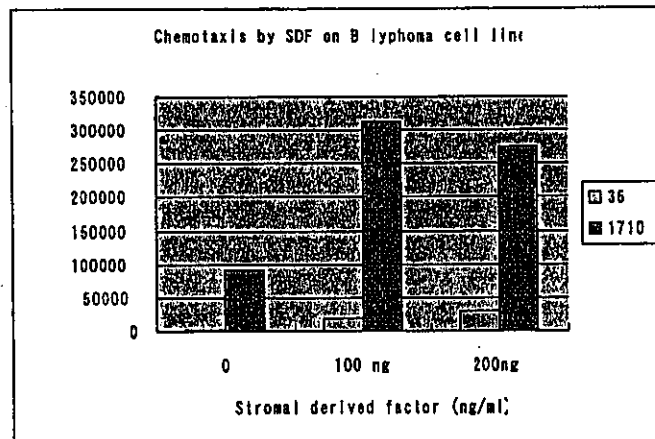


Fig.2 Chemotaxis by SDF on B cell line

研究要旨：WB 法による PrP^{Sc} の検出を容易にすること及びWBに要する時間の短縮等を目的として、アルコール類添加による PrP^C/非特異タンパクの分解促進効果及び、新規アクリルアミドゲルの使用による分析時間の短縮について検討した。その結果、2-ブタノール（5%）を添加してプロテイナーゼK（PK）消化をおこなうことで PrP^{Sc} 検出の妨げになる PrP^C/非特異タンパク質が完全に消化され PrP^{Sc} の検出が容易になった。また、従来のゲルの半分（4cm）の長さのゲルを用い、高電圧下で電気泳動/転写を行うことで電気泳動/転写に要する時間を2時間から30分に短縮することができた。

A. 研究目的

我々はBSEの確定診断検査においてPK処理後にもPrP^Cや抗体と非特異的に反応するタンパク質が残存し、正確な診断が妨害されることを屢々経験した。これは、試料の分散状態が一定せず、PrP^Cや抗体と非特異的に反応するタンパク質の一部がPKと接触することが出来ないミセルに取り込まれた結果と考えられる。

本研究では、ホモジネート中のPrP^C/非特異タンパクのPKに対する感受性を高めること及びウエスタンブロット法に要する時間の短縮等を目的として、アルコール類添加によるPrP^C/非特異タンパクの分解の促進効果及び、新規アクリルアミドゲルの使用による分析時間（電気泳動）のついて夫々検討した。

B. 研究方法

1. PrP^C/非特異タンパクの分解の促進：20%ウシ延髄ホモジネート（250ul）を同量の界面活性剤（4% zwittergennt3-14, 2% Sarkosyl）で分散させた反応液に各種短鎖アルコール類を添加（2.5%、5%）し、200KHの水浴型超音装置で再懸濁したものを酵素反応の試料として20ugのPKで消化して、牛海綿状脳症（BSE）確認検査要領に従ってWBを行い、アルコール類添加がバックグラウンド及び（PrP^{BSE}）の回収に及ぼす影響について検討した。
2. 新規アクリルアミドゲルの使用による電気泳動時間時間の短縮：牛海綿状脳症（BSE）確認検査要領で標準ゲルとして用いられている Invitrogen社（8x8cm）及びDRC社（8x4cm）を用いて分析時間、感度等を比較した。

C. 研究結果

PrP^C/非特異タンパク質のPK感受性は添加するアルコール類の疎水性部分が大きく影響しており、2-BuOH>1-BuOH>IsoPrOH>nPrOH>EtOH>MeOH の順で分解促進効果が認められ、5% 2-BuOH を添加したものはプロット上で PrP^C/非特異タンパクを全く認めなくなった。また、2-BuOH の添加で PrP^{BSE} が過剰に分解され、感度の低

下をきたす事も無かった。

一方、新規ゲルは400-500Vの高電圧を用いることができ、電気泳動に15分、転写に18分と従来の電気泳動システム（泳動60分、転写60分）に比べて検査に要する時間を大幅に短縮することが可能であった。また、PrP^{Sc}（マウス、ウシ）のECLによる発色も従来のシステムで行ったものと遜色無く行うことができた。

D/ E 考察/結論

ウエスタンブロット法あるいはELISA法等の免疫生化学的方法でプリオン病を正しく診断する為にはPrP^Cあるいは抗体と非特異的に反応するタンパク質がPKで完全に消化されている必要がある。2-BuOHを系に添加することで食肉検査場で行われているELISA法によるBSE一斉検査における疑陽性反応の抑止にも有効とかがえられる。

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)「プリオン病のプロテオーム解析」大内史子、山河芳夫、西島正弘（国立感染研・細胞化学部）
第75回日本生化学会大会（京都）2002.10月
(2)「ウイルス感染時におけるプリオンタンパク質の機能関与」中村優子¹、山河芳夫¹、西島正弘¹、佐伯圭一²、小野寺節²、¹国立感染研・細胞化学部 ²東大大学院・農学部・応用免疫
第75会日本生化学会大会（京都）2001.10月第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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書
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とELISA標準品への適用-

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)のイムノアッセイに用いる標準品の確保を目的とし、ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gが産生する蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP^{res})の性質を調べた。また、測定試料の前処理法に用いられるProteinase K (PK)消化行程を含めた競合的ELISAへの適用を試みた。

マウス・抗ヒトPrPモノクローナル抗体6H4を用いたイムノブロット法で、T98G細胞を短期間の継代後に播種して調製したWCLは、PK処理(10 µg/ml, 10分間, 37°C)でPrPに相当するバンドを示さなかった。一方、長期間の継代後に播種して調製したWCLでは、PK処理抵抗性のPrP^{res}に相当する31 kDaのバンドを示した。WCLをPK処理後にPNGase Fで糖鎖を切断すると、その分子量は18 kDaを示し、T98G細胞が産生するPrP^{res}はType2に分類された。T98G細胞から調製したmRNAをRT-PCRで増幅後にダイレクトシーケンスをした結果、PrPのコーディングシーケンスに変異はなかったが、コドン129がMet/Valの多型性を示した。PK処理でN端側を消化されたPrP^{res}は、6H4が認識する144-152残基のエピトープを有していたが、109-112残基を認識する3F4には反応性を示さなかった。また、長期間培養したT98G細胞subcloneの104株は高濃度のPK処理耐性を示し(250 µg/ml, 60分間, 37°C)、解凍後に短期間培養した細胞もPrP^{res}を産生した。

正常ウシ脳抽出液をPKで処理後(50 µg/ml, 60分間, 37°C)に組換えウシPrPを固相抗原として用いた競合的ELISAで測定した結果、PrPの含有量は測定限界以下であった。一方、T98G細胞抽出液では、PK処理後に約30%のPrP^{res}が残存した。以上の結果から、T98G細胞が産生するPrP^{res}は、PK処理を含めた食品試料等の前処理法における標準品に適用可能なことが示唆された。

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Proteinase K (PK)処理を含めた試料前処理法に適用可能なイムノアッセイの標準品の確保を目的とし、次の項目について検討した。

1. 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質(PrP^{res})の調製
2. PK消化前処理法に用いるPrP^{res}標準品の競合的ELISAによる測定

B. 研究方法

1. イムノブロット法

ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gを培養後、全細胞溶解液(whole cell lysate, WCL)を調製し、SDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写した。各種の抗ヒトPrP抗体を用いたイムノブロッティングを行い、化学発光法でPrPを検出した。

2. 蛋白質分解酵素消化

T98G細胞のWCLを各種濃度のPKを用いて37°Cで消化し、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。

3. 競合的ELISA

固相抗原に組換えウシ・プリオン蛋白質(rBoPrP)を、第1抗体に抗ヒトPrP抗体6H4を用いた競合的ELISAを行い、PK処理した試料に含まれる

PrP^{res}を測定した。

C. 研究結果

1. 蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質の調製

イムノ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3回の継代後に播種して38日後にWCLを調製し、10 µg/mlのPKで消化後(37°C, 10分間)にイムノブロット法を行うと、6H4が認識する未処理の35 kDa及び31 kDaにPrPに相当するバンドは全て消失した(Fig. 1A)。一方、13回の継代後に播種して39日後に調製したWCLでは、10-20 µg/mlのPKで60分間の消化に抵抗性な31 kDaのバンドを示した(Fig. 1B)。T98G細胞と同様にPrPのmRNAを発現しているヒト・アストロサイトーマ細胞株U373MGを用いて同様の実験を行ったところ、11回の継代後に38日間培養して調製したWCLはPK抵抗性を示さなかった(Fig. 1C)。また、T98G細胞を3回の継代後に150日間培養して調製したWCLもPK抵抗性を示さなかった。以上の結果から、T98G細胞のPrP^{res}産生には長期間の培養だけではなく、長期間の継代が必要なことが示唆された。

次に、T98G細胞が産生するPrP^{res}の各種特異性を調べた。長期間培養したT98G細胞のWCLをPK処理後にPNGase Fで糖鎖を切断すると、その分子量は18 kDaを示した。T98G細胞から調製したmRNAをRT-PCRで増幅後にダイレクトシーケ

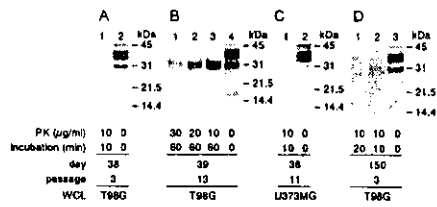


Fig. 1. Protease-resistant form of PrP production in T98G cells increased in a long term-incubation at relatively high-passage number. T98G cells and U373MG cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 and analyzed by digesting the whole cell lysates with PK under the following conditions. A: T98G cells were incubated for 38 days at passage 3 (P3D38) and the lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (10 μ g/ml) at 37°C for 10 min (lane 1) or left undigested (lane 2). B: T98G cells were incubated for 39 days at passage 13 (P13D39) and the lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK at different concentrations (30, 20, 10 μ g/ml) at 37°C for 60 min (lanes 1-3) or undigested (lane 4). C: U373MG cells were incubated for 38 days at passage 11 (P11D38) and the lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (10 μ g/ml) at 37°C for 10 min (lane 1) or left undigested (lane 2). D: T98G cells were incubated for 150 days at passage 3 (P3D150) and the lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (10 μ g/ml) at 37°C for 20 to 10 min (lanes 1-2) or left undigested (lane 3). The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with 6H4 antibody.

ンスをした結果、PrPのコーディングクエンシスは既報のPrP遺伝子(A1008282)の塩基配列と一致して変異はなかったが、コドン129がMet/Valの多型性を示した。イムノブロット法で各種抗PrP抗体が認識するPrP^{Res}のエピトープを調べたところ、PK処理したWCLはN末端(25-29残基)を認識する



Fig. 2. Analysis of deglycosylated form of PrP in T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 36 days at passage 30 (P30D36) and whole cell lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (50 μ g/ml) at 37°C for 30 min (lanes 1 and 2) or left undigested (lanes 3 and 4). All lysates were incubated with (lanes 1 and 3) or without (lanes 2 and 4) PNGase F for 120 min. The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with 6H4 antibody.

HUC2-13及び中間部位(109-112残基)を認識する3F4には反応性を示さなかった(Figs. 3A and 3B)。一方、中間部位(144-152残基)を認識する6H4はPK処理後もPrP^{Res}に相当するバンドを示した(Fig. 3C)。また、C末端(214-230残基)を認識するHPC2は、PK未処理のWCLには反応性を示さないが、PK処理後にPrP^{Res}に相当する31 kDaのバンドを認識した(Fig. 3D)。

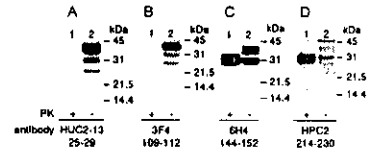


Fig. 3. Immunoblot analysis using anti-PrP antibodies for protease-resistant form of PrP in T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 39 days at passage 13 (P13D39) and whole cell lysates were prepared. Fifty μ g of the lysates were treated with PK (10 μ g/ml) at 37°C for 10 min (lane 1) or left undigested (lane 2). The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with HUC2-13 (A), 3F4 (B), 6H4 (C) or HPC2 (D) antibodies. Epitope recognition sites located within PrP were shown as a residues number.

PrP^{Res}を安定して産生する細胞の確保を目的とし、長期間の継代後にT98G細胞を培養を行い、PrP^{Res}の産生を確認後に細胞を液体窒素中に保存し、解凍後にPrP^{Res}の産生を調べた。T98G細胞 subcloneの104株を3回の継代後に36日間培養すると、250 μ g/mlのPK処理(60分間、37°C)に耐性を示した(Fig. 4A)。また、培養36日間後の細胞を新たに播種すると、4日後の細胞もPrP^{Res}を産生した(Fig. 4B)。

2. PK消化前処理法に用いるPrP^{Res}標準品の競合的ELISAによる測定

PK消化前処理法に適したELISA用標準品の調製を目的とし、T98G細胞抽出液を用いて競合的ELISAを行った。40回の継代後に40日間培養したT98G細胞をPBS中に懸濁し、超音波で破碎して測定用試料とした。蛋白質量5 μ gの試料をPK処理(50 μ g/ml、60分間、4°C)し、PrPを競合的ELISAで測定したところ、正常ウシ脳抽出液の含は検出限界以下であった(Table 1)。一方、PK処理したT98G細胞抽出液では、未処理に比較して約30%が残存していた(Table 1)。

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。現在、国内の屠畜場ではウシ延髄の橋

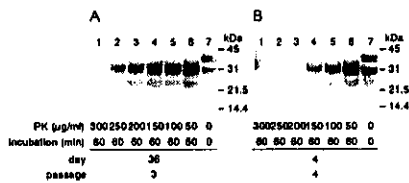


Fig. 4. Characterization of protease-resistant form of PrP in T98G104 cells. A: T98G104 cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 36 days at passage 3 (P3D36) and whole cell lysates were prepared. B: Parallel cultures (P3D36) were trypsinized and replated at 5.0×10^5 cells per 9-cm dish (55 cm²) in 10 ml medium as a Day 0 (P4D0). After 4 days incubation (P4D4), whole cell lysates were prepared. Fifty µg of the lysates were treated with PK at different concentrations (300 to 50 µg/ml) at 37°C for 60 min (lanes 1-6) or left undigested (lane 7). The lysates were boiled for 10 min and subjected to immunoblot with 6H4 antibody.

を検体とし、BSEの全頭スクリーニングを行っている。測定にはELISAを用いているが、現在は試料前処理法のPK処理を判定する有益な標準品がない。平成12年度にT98G細胞がPK処理抵抗性PrP^{res}を産生することを報告した。今年度はT98G細胞がPrP^{res}を産生する条件の検討、特異性の解析およびELISAへの適用を行った。

T98G細胞を長期間継代し、播種後に30日以上培養するとPrP^{res}を産生した。平成12年度にT98GはG1期に正常プリオン蛋白質(PrP^c)の産生量が増大することを報告したが、長期間培養してG1期に誘導するだけではPrP^{res}は産生されず、10回以上の継代が必要であった。同様な条件でヒト・アストロサイトーマ細胞株U373MGを培養してもPrP^{res}は産生されないことから、T98G細胞に特異的な現象と考えられる。

ヒトのプリオン病であるCJD由来のPrP^{res}は、PK処理後にPNGase F消化によって糖鎖を切断したPrP^{res}のSDS-PAGEによる分子量の違いから、約21 kDaを示すType1と約19 kDaを示すType 2に分類される¹⁾。T98Gが産生するPrP^{res}は、同様の処理

Table 1. Average PrP concentration before and after PK treatment by competitive ELISA using 6H4 antibody

sample	PrP concentration ^a	
	PK treated ^b	untreated
bovine brain homogenate	ND ^c	10.8 ± 0.7
T98G cells homogenate	8.6 ± 1.2	26.5 ± 1.5

^a The amount of PrP is expressed as rBoPrP equivalents. The values are mean ± S.E. (n=3).

^b PK 50 µg/ml for 60 min at 37°C.

^c Not detected.

で18 kDaを示したことからType 2と判断した。また、T98Gが発現するPrPに変異はないが、コドン129がMet/Valの多型性を示した。イムノブロット法による解析では、PrP^{res}はPK処理でN端側が切断され、PrPの研究に頻りに用いられる3F4抗体が認識するエピトープ(109-112残基)を含まなかった。一般にType1は82残基のGlyを、Type2は97残基のSer近傍をPKが切断すると報告されている²⁾。T98G細胞が産生するPrP^{res}は3F4が認識しないことから、PKの切断部位は109-112残基から6H4が認識する144残基の間と推定されるが、PK処理によってエピトープである109-112残基近傍の立体構造が変化して認識されない可能性もある。C末端を認識するHPC2はPK未処理のPrPを認識しないが、N端が消化されたPrP^{res}に反応性を示した。先にHPC2は糖鎖を切断したPrP^cを認識することを報告したが³⁾、本抗体はPK処理で残存したPrP^{res}だけに反応性を示したことから、試料をPK消化後に測定する各種のイムノアッセイ構築に有用と考えられる。

競合的ELISAでT98G細胞が産生するPrP^{res}を測定した結果、PK処理(50 µg/ml、60分間、4°C)で約30%が残存することを確認した。本条件下ではウシ脳由来のPrP^cは全て消化されたことから、PK前処理を含めたイムノアッセイの行程を通した標準品として利用可能と考えられる。また、短期間の継代後でもPrP^{res}を産生するsubcloneのT98G104株を得たことから、安定供給も可能となった。

E. 結論

平成14年度は、T98G細胞が産生するPrP^{res}の産生条件、特異性及び高産生株について研究を行った。また、得られたPrP^{res}をPK前処理を含めた競合的ELISAに適用し、標準品として利用できる可能性を示した。今後は、高濃度のPKに抵抗性を示すPrP^{res}を産生するsubcloneのT98G104株を用い、その産生様式や細胞内動態の研究を進める予定である。

F. 参考文献

- 1) Kikuchi, Y., Takeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 728-733 (2002)
- 2) Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S.G., Farlow, M., Dickson, D.W., Sima, A.A., Trojanowski, J.Q., Petersen, R.B., Gambetti, P. *Ann. Neurol.* 39, 767-778 (1996)
- 3) Parchi, P.; Zou, W.; Wang, W.; Brown, P.; Capellari, S., Ghetti, B., Kopp, N., Schulz-Schaeffer, W.J., Kretschmar, H.A., Head, M.W., Ironside, J.W., Gambetti, P., Chen, S.G., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 97, 10168-10172 (2000)

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 学会発表

1. 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、松田治男、山崎壮、棚元憲一、澤田純一：ヒト・グリオーマ細胞の蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質産生機構の解析 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都
2. 掛谷知志、菊池裕、高鳥浩介、山崎壮、棚元憲一、澤田純一：ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gにおける熱ショックによるプリオン蛋白質の発現 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都

2. 論文発表

1. Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 728-733 (2002)
2. Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J., *J. Health Sci.* 48, 288-291 (2002)
3. 武木田薫、菊池裕、山崎壮、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄、日本食品衛生学雑誌43、173-177 (2002)

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

J. 協力研究者

社団法人日本食品衛生協会非常勤職員 掛谷知志
(国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部リサーチ・レジデント)
国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 山崎壮

III 研究成果の刊行に関する一覧表

- 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.
- Kitamoto, T., Mohri, S., Ironside JW, Miyoshi, I., Tanaka, T., Kitamoto, N., Itohara, S., Kasai, N., Katsuki, M., Higuchi, J., Muramoto, T., Shin RW. Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(2): 280-286, 2002.
- Yamamoto, A., Shin RW, Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F., Kitamoto, T. Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 82(5):1137-1147, 2002.
- Ishizawa, K., Komori, T., Shimazu, T., Yamamoto, T., Kitamoto, T., Shimazu, K., Hirose, T. Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathol.* 104(4):342-350, 2002.
- 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.
- Shyu, W-C., Harn, H-J., Saeki, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Onodera, T., Chen, C-J., Hsu, Y-D., Chiang, Y-H. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol. Neurobiol.* 26: 1-12, 2002.
- Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 728-733, 2002.
- Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmyadag, D., Byambaa, B. and Shinagawa, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 75-81, 2003.
- Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Miyoshi, I., Mohri, S. and Takata, M. Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie. *J. Vet. Med. Sci.* 65(3): (in press), 2003.
- 品川森一、堀内基広、石黒直 ガストロピロール 原末のスクレイピープリオン汚染の検定 *医薬品研究* 33(7): 455-461, 2002
- 品川森一 BSE の早期診断 (牛肉は安全か?) *ファルマシア* 38: 321-325, 2002
- 堀内基広 プリオンの検出技術 *臨床検査* 46(12):1545-1551, 2002
- 堀内基広 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, 2002
- 毛利資郎、ヒト・プリオンのバイオアッセイ. *臨床検査*、46:1553-1558, 2002
- 武木田薫、菊池裕、山崎壮、掛谷知志、高鳥浩介、棚元憲一、澤田純一、谷村顕雄 競合的ELISA による食品試料中のプリオンタンパク質検出に関する検討 *日本食品衛生学雑誌* 43:173-177, 2002