

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4837353号
(P4837353)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Z N A D
 CO 7 K 7/06 (2006.01) CO 7 K 7/06
 CO 7 K 7/08 (2006.01) CO 7 K 7/08
 CO 7 K 14/00 (2006.01) CO 7 K 14/00

請求項の数 7 外国語出願 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2005-284933 (P2005-284933)
 (22) 出願日 平成17年9月29日(2005.9.29)
 (65) 公開番号 特開2006-105988 (P2006-105988A)
 (43) 公開日 平成18年4月20日(2006.4.20)
 審査請求日 平成20年8月25日(2008.8.25)
 (31) 優先権主張番号 60/614,533
 (32) 優先日 平成16年9月30日(2004.9.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501131014
 オーソークリニカル・ダイアグノスティック
 クス・インコーポレイテッド
 Ortho-Clinical Diag
 nostics, Inc.
 アメリカ合衆国、14626-5101
 ニューヨーク州、ロチェスター、インディ
 ゴ・クリーク・ドライブ 100
 100 Indigo Creek Dr
 ive, Rochester, NY
 14626-5101, U. S. A.
 (74) 代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンの特徴のためのペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(配列ID番号1) W Q P P R A R I からなる群から選ばれたペプチドを含む Pr P^{Sc} を検出するための試薬。

【請求項2】

Pr P^{Sc} の検出方法であって、
 最初に、サンプルを請求項1に記載のペプチドと接触させ、
 ついで、Pr P^{Sc} を検出する、
 ことを含む検出方法。

【請求項3】

Pr P^{Sc} を検出するための免疫学的検定法であって、
 請求項1に記載のペプチドを結合させた固体担体を供給し、
 当該固体担体をサンプルと接触させ、
 当該担体を洗浄して結合していないサンプルを除去し、
 当該固体担体をプリオンに対し特異性を有する抗体に接触させ、
 Pr P^{Sc} が当該固体担体に結合しているかどうかを決定する検出ステップを実行する
 ことを含む免疫学的検定法。

【請求項4】

Pr P^{Sc} の検出のためのキットであって、
 請求項1に記載のペプチドを結合させた固体担体と、

ラベル付けされた、プリオンに対し特異性を有する抗体と
を含んでなるキット。

【請求項 5】

PrP^{Sc}の検出方法であって、
サンプルをプリオンに対し特異性を有する抗体に接触させ、ついで、ラベル付けされた、
(配列ID番号1)WQPPRARIからなる群から選ばれたペプチドに接触させ、P
rP^Sを検出することを含む、方法。

【請求項 6】

PrP^{Sc}を検出するための免疫学的検定法であって、
プリオンに対し特異性を有する抗体を結合させた固体担体を供給し、
当該固体担体をサンプルと接触させ、
当該担体を洗浄して結合していないサンプルを除去し、
当該固体担体を、ラベル付けされた、(配列ID番号1)WQPPRARIからなる群
から選ばれたペプチドに接触させ、
PrP^{Sc}が当該固体担体に結合しているかどうかを決定する検出ステップを実行する
ことを含む免疫学的検定法。

10

【請求項 7】

PrP^{Sc}の検出のためのキットであって、
プリオンに対し特異性を有する抗体を結合させた固体担体と、
ラベル付けされた、(配列ID番号1)WQPPRARIからなる群から選ばれたペ
チドと
を含んでなるキット。

20

【発明の詳細な説明】

【開示の内容】

【0001】

〔背景〕

プリオン病または伝達性海綿状脳症(TSE)は、これらが感染物質の性質についての従来
の考えに異議を唱えるものであるのみならず、食物と血液の安全性に対してもた
潜在的に重大な公衆衛生上の脅威ともなることから、科学界の関心をとらえてきた。さら
に、近年、新しい変異型疾病であるvCJDの流行により、動物とヒトとの間における病
気感染の可能性が劇的に強調されるようになってきた。本発明は、動物およびヒトにお
ける伝達性海綿状脳症{Transmissible Spongiform Encephalopathies(TSE)}疾患の診断
に対する合成ペプチドの使用に関するものである。

30

【0002】

〔プリオン-TSEを生じさせる病原体〕

伝達性海綿状脳症(TSE)には、ヒトと動物との両方に感染する、一群の、急速に
進行する、致命的な神経変性疾患が含まれる。TSEは、壊滅的な痴呆、筋間代性痙攣を
伴う錐体路徴候および錐体外路系徴候、多病巣性の海綿状変化、アストログリオーシ
ス、アミロイドプラーク、ニューロンの消失および炎症反応の不在等の臨床的および
神経病理学的特徴を有し、通常、長い潜伏期間によって特徴づけられる。

40

【0003】

TSE疾患が、「スローウイルス」またはウイロイドに起因するかもしれないと示唆
されたこともあった(Gajdusek, 1977年)。しかしながら、放射線、ヌクレ
アーゼおよび遺伝物質を傷つけるその他の試薬に対するスクレーピーの伝染力の極端に
大きい抵抗力は、「ウイルス」説とは矛盾するものである。TSE感染因子のこれら全
ての「異常な」特徴に対し、1982年に、スタンリー・プルジナー(Stanley Pr
usiner)博士が「プリオン」の概念を提唱した(Prusiner, 1982年)。
(核酸を含まない感染性タンパク質粒子を意味する)プリオン(PrP)は、ヒトと動物
とに存在する糖タンパク質である。このタンパク質の細胞型(PrP^C)は、二つのN-

50

結合糖鎖形成サイトとC末端の GPI アンカーとを有する。これはニューロンで見つかるのが最も普通であり、その他の細胞（たとえば白血球、単核細胞および血小板）でも見つかっていたがその頻度はずっと小さかった（Hollada, 2000年）。プリオンタンパク質の感染性スクレーピー疾患型（PrP^{Sc}）は、その細胞前駆体のプロテアーゼ抵抗性のイソ型であり、主に脳で見つかる。これは、vCJD患者の扁桃、脾臓およびリンパ節でもずっと低レベルで見つげだされている（Parizek, 2001年）。「プリオン」が、スクレーピー疾患の原因となる病原体であるというブルジナーの概念の結果およびその拡張により、全てのTSE疾患の病原体について、このタンパク質に関連すると思われる一群の病状を説明するために、一般的にプリオン病と呼ばれる概念が使用されるようになった。

10

【0004】

ヒトのプリオン病は、クロイツフェルト - ヤコブ病（CJD）として知られており、通常高齢者が罹患する。疾病の表現型に依存して、大部分のCJDは、散発性（sCJD）であり、約10%が家族性のCJD（fCJD）である。ごく最近になって、若年の成人で起こる新しい変異型のCJD（vCJD）が現れた。1995年以降、100を超える症例が報告されている。プリオン病は、家畜および野生動物の多くの種が罹患する。このことは、たとえば、ヒツジとヤギのスクレーピー（McGowan, 1922年）、シカ類の慢性消耗性疾患（CWD, Williams, 1980年）およびウシの牛海綿状脳症（BSEまたは「狂牛」病, Wells, 1987年）といったユニークな名称がしばしば与えられていることに現れている。

20

【0005】

〔PrP^CとPrP^{Sc}の特徴〕

ブルジナーの「タンパク質のみ」仮説によると、プリオン病を引き起こす感染性の病原体はタンパク質である。プリオンの主要成分は、PrP^{Sc}（疾病に特有の「スクレーピー」イソ型）と呼ばれる折返しの異常なPrPであるようである。PrP^{Sc}は、その正常な対応物（PrP^C）から、立体構造の変化により発生するものと考えられている（Cohen, 1998年）。この変換のメカニズムに関して曖昧さがまだ残っているが、PrP^{Sc}の存在下、基質として働く正常なPrP^Cが、立体構造の変化を受け、自己触媒的プロセスによりPrP^{Sc}になり、その結果、PrP^{Sc}凝集体とアミロイドロッドとを形成し、これにより細胞死を引き起こすことが広く受け入れられている（Hope, 1986年、Horwich, 1997年）。PrP^CからPrP^{Sc}への構造変化は、タンパク質の - シート構造の量の著しい増大と、おそらく、円二色法と赤外分光法によって示される - らせん量の僅かな減少が関与する、決定的な立体構造変化によって裏付けられることがほとんどである。（Pan, 1993年, Caughey, 1991年）。PrP^CからPrP^{Sc}への変換の効率率は、2つのPrP配座異性体間における配列相同性の程度に依存するようである。このユニークなメカニズムのため、プリオン病は、同一の種の間で容易に伝達でき、PrPの配列相同性が十分である場合には、種から種に伝達することができる（Raymond, 2000年）。したがって、提唱されたプリオン病の伝達機構が正しいければ、動物とヒトとの間におけるこれらの脳障害の伝達によって、伝染病が引き起こされる可能性がある。

30

40

【0006】

プロテアーゼ抵抗性は、PrP^{Sc}とPrP^Cとを区別するもう一つの特徴である。培養細胞と脳とにおいて、または、多くのGSS患者からのサンプルにおいて、PrP^{Sc}はその細胞前駆体であるPrP^Cより小さい。細胞プリオンとスクレーピープリオンとは、同じPRNPゲノム生成物の2つのイソ型であるが、PrP^{Sc}がプロテイナーゼK処理で限定的に消化されるだけであるのに対し、PrP^Cは完全に分解される。この消化により、N末端が取り除かれた、PrP²⁷⁻³⁰と称されるタンパク質の一種が得られる。PrP²⁷⁻³⁰は、PrP^Cを宿主とするPrP^{Sc}複製のために必要なPrP^{Sc}のコアであると仮定されてきた。プロテアーゼで処理されたプリオン分子、PrP²⁷⁻³⁰すなわちPrP^{res}は、スクレーピーの伝染力と密接に関連しており（Gabizon

50

、1988年)、PrP^{Sc}が伝染性のタンパク質であることの更なる証拠ともなっている。

【0007】

おそらく - シート構造の著しい増加と、同時に生じるプロテアーゼ抵抗性に関連するさらなる特性は、PrP^{Sc}とPrP^Cとの間に観察される溶解度の相違である。PrP^Cは可溶タンパク質であるが、PrP^{Sc}イソ型は高度に難溶性である。さらに、PrP^Cが、膜組織に固定されたGPIのテールを介してニューロンの表面に付着する形態で見出される(Shyng, 1994年)のに対し、PrP^{res}は、罹患細胞の細胞質中に見出され(Taraboulos, 1990年)、後期エンドソームおよびリソソーム区画に最も関連するようであり(Arnold, 1995年)、PrP^{Sc}は、感染した脳からの濃縮分中の非晶質の凝集物からも見つかっている(Meyer, 1986年)。

10

【0008】

スクレーピーの伝染力とPrP²⁷⁻³⁰の間の密接な関連を示す証拠は増えつつある。もっとも純粋なサンプルにおいてさえ、PrP分子と感染単位との推定比率は、 $\sim 10^4$ から 10^5 である(Horwich, 1997年、Bolton, 2001年)。このような低い伝染力レベルでは、伝染に、他の構成要素、共因子または共有結合修飾が必要であることもあり得る。キメラのヒト-マウスPrP^Cを発現するマウスの感染性についての遺伝子組換え研究では、PrP^C以外の少なくとも1つの宿主因子(暫定的に第X因子と呼ばれており、PrP^{Sc}の形成に分子シャペロンとして機能するかもしれない)の存在が示唆されている。(Telling, 1995年)。

20

【0009】

〔プリオン病の伝染力と伝達率〕

プリオン病は感染性を有する。動物のプリオン病の伝達率は、ヒツジからヒツジへのスクレーピー(Cuillie, 1936年)およびヤギへの種を超えたスクレーピー(Pattison, 1957年)ならびにヒトからチンパンジーへのクルおよびCJD(Gajdusek, 1966年、Gibbs, 1968年)等の、感染した動物から健康な動物への脳ホモジネートの接種によって実験的に確立されてから久しい。スクレーピーのマウスへの感染の成功は、重要なブレイクスルーであった(Chandler, 1961年)。これにより、実験モデルが提供され、TSE研究が大いに促進された。ウシにおける最近のBSEおよびヒトの新しい変異型CJD(vCJD)の原因は、BSEの場合には、動物への飼料として与えられたスクレーピーヒツジの死体の混合物を食べた結果であり(Brown, 1997年)、vCJDの場合は、BSEに感染したウシからの牛肉を食べた結果である(Bruce, 1997年)と考えられた。vCJDとBSEとの間の関係は、BSE順応性を有するマカク(ヒトに最も近いモデル)およびBSEおよびvCJDを引き起こす物質を接種した同系交配のマウスの研究から得られた神経病理的証拠によりさらに支持されている(Lasmezas, 1996年)。北米におけるミュールジカおよびヘラジカへのCWDの流行への具体的懸念としては、CWDが、BSEのように、狩猟を通してこの病気に曝露されまたは、感染した肉を取り扱ったり食べたりする可能性のあるヒトに感染され得るかどうかということである。これまで、人食いの風習による死者の脳組織の摂取によるクルの流行ならびに、ホルモン、組織移植および汚染された医療器具の使用によるCJDの医原性の感染等の、ヒトにおける悲劇的な偶然によるプリオン病の感染が報告されてきている。

30

40

【0010】

CJD病が、種間のバリアがあるのかも知れない動物のTSEと関連があることを示す確かな証拠はない。クルの流行は、ヒトの後天性プリオン病の最も大きな証拠を提供した。これまでヒト同士の間での感染による犠牲者としてのvCJD患者の報告はないが、BSEとvCJDとの間の密接な関連はかなりの注意を惹いてきた。ヒトの感染についての心配は、PrP^{Sc}がBSEとvCJDのリンパ細網組織中で簡単に検出可能であるが、古典的なCJDではそうではない(Hill, 1997年)という観察と、ヒツジからウシへ継代したスクレーピーの病原体が宿主の範囲を変え、ヒトにより適応できるようになるか

50

も知れないという推定とに基づいている。そのような挙動の実験的先例は周知である：スクレーピーのマウスに適応した株がハムスターを通過する継代により、マウスへの逆継代での伝達率が変化した（Kimberlin, 1987年、Kimberlin, 1989年）；ヒトのクルまたはCJDの株は、霊長類または猫を介する継代まで、フェレットやヤギに感染しなかった（Gibbs, 1979年）；また、BSEのウシ株は、マウスを介する継代までハムスターに感染しなかった（Foster, 1994年）。あるいは、BSEがウシにおける自発的突然変異に起因したものである場合、この伝達性海綿状脳症（TSE）の新しい株への種の感染性の実験的研究は、ヒトが感染されやすくないと予測する程には十分に進まなかった。

【0011】

ヒトのCJD病とvCJD病とに関する研究から、ゲノム感染性が、ヒトにおけるTSEの広がりに影響する可能性のあるもう一つの要因であるかもしれないことが示された。散発性のCJD患者の大多数が、コドン129におけるMet/MetまたはVal/Valに対し同型接合的である（Belay, 1999年）ことが見出された。しかしながら、既報告のvCJDの症例は、全て、Met/Metに対し同型接合的であった。

【0012】

vCJDの流行の規模と期間はまだ明らかでない。なされた推定と採用されたモデル計算とに従って、種々異なる予測が提案された。vCJD全体についての1つの評価によれば、僅か205の症例が予測された（Valleron, 2001年）。他方、もう一つの予測によれば、もし感染がBSEだけから来るものであるならば、次の80年間におけるvCJD死亡率は50から50,000まで変動する。BSEがヒツジに感染するものであり、ついで、ヒトの食物連鎖に入り得るものであるならば、その数は150,000にも達し得る（Ferguson, 2002年）。必要なパラメータが誤っているか入手不能である場合には、正確な予測をすることは不可能であるが、血液にvCJDの伝染力があるとすると、どのような予測も控えめなものになるという一事のみは確実である。さらに、vCJDが新しい疾病であることが証明されたのは、単にヒトにおけるCJDの調査が増加した結果ではない（Hillier, 2002年）。

【0013】

BSE発生の広がりを除くために、政府による対抗策がとられた。米国および英国で反芻動物タンパク質の飼料が禁止された（1988年）。感染した恐れのある肉がヒトの食物連鎖に入るのを防止するために、一連の対策も講じられた。ヒトへの危険をさらに減らすために、FDAとCBERは、2001年8月に、1980～1996年の間に累計6ヵ月以上英国に滞在したドナーを無期限に保留する新しい方針を打ち出した（FDA, 2001年）。

【0014】

〔プリオン病の診断検査法〕

プリオン検出の感度と信頼性の高い検査法の発展は、疾病の調査、リスクアセスメントならびに、将来の治療法と組み合わせられた時には疾病の防止および根絶の絶対的必須条件である。現在、プリオン病の診断には、3つの基本的な評価フォーマットがある。（1）動物の伝染力のバイオアッセイ：これは、齧歯類の実験的なスクレーピーにおける、伝染性プリオンの測定に関する最も感度の高い方法であり、通常、患畜の脳ホモジネートのレシピアント動物への脳内注射によって達成される。しかしながら、種々異なる動物種におけるプリオン病の伝染力の定量的測定には、「種バリア」による限界があり、病理学、潜伏期間および、PrP^{Sc}の分子的特徴が異なる、はっきりと区別できるプリオン「株」が存在する。したがって、この時間のかかる高価な死後診断法は、大部分は、齧歯類で種々異なるプリオン株を識別するための研究道具として使われており、伝染性の脳物質の較正のための参照としての役割を果たしている。（2）現在のPrP免疫学的検定法：これらは、全てのプリオン病中唯一知られた品質保証付き分子であるプロテアーゼ耐性PrP^{Sc}の検出に基づく方法である。免疫化学的方法（免疫組織化学およびウェスタンブロットング法）によるPrP^{Sc}の検出は、長年、動物およびヒトにおけるプリオン病の最も正

10

20

30

40

50

確な診断を提供してきた (Schaller, 1999年、Biffiger, 2002年)。これらは、死後診断のために広く使用されている。この目的のために、PrPの種々の領域に対して、米国特許第4806627号明細書および欧州特許第0861900号明細書に記載され、広く使用されている3F4、6H4等多くのモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が育てられてきた。しかしながら、PrP^C (しばしば、ずっと大量に存在する) とPrP^{Sc}とを区別することができる方法とは非常に少なかった。1997年にコース (Korth) によって、そして、2003年にパラミチオチス (Paramithiotis) によって報告されたモノクローナル抗体は、両方共IgMであり、これらの抗体による診断評価法は開発されなかった。この結果、現在の免疫化学的方法は、ほとんどすべて、PrP^{Sc}の検出の前に、通常、プロテイナーゼK (PK) 消化等の非特異性のプロテオリシスによって、PrP^Cを減少させるか除去するステップが必要である。このような前処理によって、PrP^{Sc}の最初の60~70残基から、PrP^{res}と呼ばれる、PK耐性を有するPrP27kDa-30kDaのコアが生じる。ついで、N-末端を切断したPrP^{Sc}すなわちPrP^{res} (病理学的サンプルだけに存在する) を検出するのに、このタンパク質の残りのC末端領域を認識する抗PrP抗体を使用することができる。組織切片には、免疫組織化学的染色のために、通常、PrP^C関連のバックグラウンドを減少するための酸加水分解による前処理も行われる。それゆえ、PrP^{res}は、これらの免疫学的検定の前駆体PrP^{Sc}の代用品である。種々の免疫学的検定フォーマットの間で、ウェスタンブロッティングは、ジ-、モノ-および非グリコシル化PrPバンドのマイグレーションに基づくPrPの詳細な分子パターンを明らかにするという長所がある。この方法は、ヒトおよび動物のプリオン病における異なった脳PrP^{res}のサブタイプを識別するためにも、広く使われてきた。現在では、より高いサンプル処理能力、より高い感度およびよりよい品質のために、ウェスタンブロット法以外の他の評価フォーマット { 従来のELISA、解離促進ランタニド-蛍光免疫検定法 (DELFLIA, Barnard, 2000年および米国特許公開第20020137114A1号明細書に記載された方法) および、ELISAと蛍光検出法と組み合わせた立体構造に依存する免疫学的検定法 (CDI) (Safar, 1998年、米国特許公開第20010001061A1号明細書、米国特許公開第20020001817A1号明細書) 等 } が開発されてきた。しかしながら、フォーマットに関係なく、PrP^{Sc}は、必須の処理であるPK消化後のみPrP^Cと選別し得るが、これでは、異種の生体サンプルについて最適化を図るのは困難であろうと思われる。(3) ヒツジのスクレーピーの臨床前診断のための第三眼瞼リンパ系組織の免疫組織化学処理を含むサンプル処理 (O'Rourke, 2000年、米国特許第6165784号明細書、米国特許第6261790号明細書)、脳および他の末しょう組織ホモジネートからのPrP^{Sc}を濃縮するタングストリン酸ナトリウムによる化学的処理 (Wadsworth, 2001年) および、患者および患者の尿中のプリオンタンパク質の新しいイソ型の検出 (Shaked, 2001b年、国際公開第0233420A2号パンフレット) のためのその他の方法も報告されている。キャピラリー電気泳動法およびフーリエ変換赤外分光法等の他の検出システムも報告されている。これらの方法は、まだその開発の初期段階にあり、技術的に複雑である。細胞プリオンを除去し、ついで、無差別に抗プリオン抗体認識を行うことによる、病原性プリオンの従来の識別法に加えて、PrP^{Sc}をPrP^Cから区別できる、プラスミノーゲンおよびフィブリノーゲン等の他の試薬が見出された。得られた証拠から、プリオン一次配列または個々のPrP^{Sc}分子の特定の三次構造よりは、むしろ、種々の種のPrP^{Sc}に共通する性質が、プラスミノーゲンとの結合の原因であり得ることが示唆された (Fischer, 2000年、Maisson, 2001年)。病原性プリオンタンパク質の捕捉と検出のためのプラスミノーゲンおよびその他の血清/血漿タンパクの使用への応用は、国際公開第0200713号パンフレット特許および米国特許公開第20010053533A1号明細書に記載されている (Aguzzi, 2001年)。

【0015】

現在製造されているプリオン診断評価装置は、すべて、サンプル源として脳組織を使用

10

20

30

40

50

している。1999年の欧州委員会は、異なるメーカーからの4つのBSEテストキットを評価した(Moynagh, 1999年)。それらの全てが別個のサンプル調製手順を必要としていた。キットの指示書に依存して、変性、PK消化またはPrP^{Sc}濃縮等の脳組織ホモジネートの処理が必要であった。DELFIA、免疫プロットまたはプレートELISAフォーマットで使用される評価検出システムでは、化学発光基質または比色基質が使用されていた。

【0016】

〔プリオン病の生前診断への挑戦〕

PrP^{Sc}ベースの生前評価に共通の課題は、PrP^{Sc}が末しょう組織または体液中に存在するかということである。技術的な困難性のため、PrP^{Sc}の存在または、体液中におけるそれに関連した伝染については、実験データがほとんどなく、この課題には議論の余地がある。スクレーピーのハムスターモデルでは、血液中に低レベルの伝染力を検出し得る。罹患したハムスターの血液に由来するリンパ球リッチな軟膜における伝染力は、血漿に由来するものよりも大きい。全血液接種物と比べると、相対的に小さな割合を占めるだけである。血液中に存在しているこの感染因子の分子的定义は明白でない。散发性のCJD患者におけるリスク因子と可能な感染源とを調査した結果、病気と、食物、輸血または他の血液産物の受容との間に有意の相関性は見出されなかった。初期のレポートでは、マウスへの脳内接種の後に、CJD患者から得た血液における伝染力の存在の可能性が示されたが(Manuelidis, 1985年、Tateishi, 1985年)、古典的なヒトのプリオン病では、vCJDの場合を除いて、最も高い伝染力の量すなわちPrP^{Res}量は、常に中枢神経系(CNS)で見つかり、末しょう組織での発見には一貫性がない。vCJD患者の、扁桃、脾臓およびリンパ節等の周辺リンパ細網組織で容易に検出できるPrP^{Sc}の存在により、リンパ細網組織に大量に存在するPrP^{Res}が、循環系と相互作用し、その結果、ごく僅かのPrP^{Sc}がvCJD患者の血液中に存在し、血液感染を引き起こすかも知れないと言う深刻な不安が生じた。血液中における他のTSEの伝染力は、種々の実験動物でも証明されてきている。伝染力研究のための血液の大部分は、TSEに順応した齧歯類(たとえばマウスおよびハムスター)から得られていた。マウスに順応したBSE、マウスに順応したvCJDが、脳内感染および静脈内感染を通して確立されてきた。唯一の例外モデルはヒツジで行われた研究であった。この実験では、BSE脳溶解物を接種した他のヒツジから取った全血液を輸血されたヒツジが、BSEの徴候を現した(Houston, 2000年、Hunter, 2002年)。しかしながら、これらの実験結果は、まだ十分検討される必要がある。そのような血液中の感染因子の検出が、PrP^{Sc}とTSE疾患との関係をよりよく理解することの助けになることが期待されている。

【0017】

PrP^Cバックグラウンドを除去するためのサンプル処理の厳しさは、タンパク含有量の相違、この評価法を多数のサンプルに適用することの困難性または、プロテアーゼに敏感なPrP^{Sc}折り畳み中間体または、わずかな量の本物のPrP^{Sc}についてさえ除去が不可避であることによる検出感度の低下のため、その他の末しょう組織試料や体液のためには適切でない場合があることは注意する必要がある。このことは、低レベルのPrP^{Sc}のみが存在し得る、末しょう組織および体液を使用する評価に特に該当する(堀内, 1999年、Jackson, 1999年、Swietnicki, 2000年)。これらの懸念のため、PrP^{Sc}に高い親和性を示し、タンパク分解処理の不要な特定の検出を可能とする免疫学的な試薬の開発が必要とされている。

【0018】

〔PrP^{Sc}検出のための新規な捕捉試薬の発見〕

「タンパク質のみ」または「プリオンのみ」説を受け入れるか受け入れないかに拘わらず、プリオン病の病因に貢献するかもしれないプリオン以外の剤または分子を探索するために継続的な努力が払われている。この探索は、答えを得ていない多くの疑問が推進力になっている。たとえば、合成された、いかなる汚染もないプリオンタンパク質は病気を引

10

20

30

40

50

き起こさない。正常な PrP^C の病原性 PrP^{Sc} イソ型への変換を誘発するメカニズムは知られていない。もう一つの未解決の疑問は、動物とヒトとで観察される（病気の潜伏期間、糖鎖形成レベルおよび障害パターンによって定義される）種々のプリオン病の表現型に関連する。単一の $PrNP$ 遺伝子型について同系交配のマウスの同型接合体の連続継代の後、全てのスクレーピー株が、その元の疾病プロフィールを保持していた。これらの観察により、研究者は、種々の表現型の株が同一の細胞プリオン前駆体の異なる立体構造のイソ型によって支配されたものであるのか、あるいは、遺伝し得る株の表現型を決定するもう一つの要因があるのかどうかについて疑問を持つようになった。実際、無細胞反応で造られた試験管内の変換モデル PrP^{res} は、動物中で新しい TSE 伝染力を構成する様子を見せなかった（Caughey, 2003年）。これらの疑問のため、Prusinerが提案した「Xタンパク質」と呼ばれる未知の要素があると多くの人々が考えるようになってきているが、いまだ発見には至っていない。

【0019】

$PrNP$ 遺伝子について、動物の同型接合体における、異なった表現型を持つスクレーピー因子の異なる株の伝播を説明するために、プリオン粒子における強く結合したRNAまたはDNA分子の存在が提案された（Weissmann, 1991年）。リターンリフォーカシングゲル電気泳動法による高度に精製されたスクレーピープリオンの分析により、残留する核酸のサイズが小さいことが判明した（Kellings, 1992年）。しかしながら、最近のレポートで、Narangが、スクレーピー-ハムスターの脳から精製したssDNAと非病原性プリオンとを混ぜ合わせたものを接種した動物が臨床的病状を示したと報告している（Narang, 2002年）。この発見に基づいて、彼は、ssDNAによってコードされた「アクセサリタンパク質」が、 PrP^C から PrP^{Sc} への変換に関与しているかもしれないという仮説を立てている。これらの試験管内の立体構造と変換の研究に基づいて、DNAが、 PrP^{Sc} 立体構造の保護者としての働きと共に、 PrP^{Sc} 変換および凝集を促進する促進剤としても働くという仮説が提案された（Cordeiro, 2001）。ごく最近では、試験管内での PrP^C から PrP^{res} への化学量論的变化には、特定のRNA分子を必要とするという報告がなされている（Deleault, 2003年）。 PrP^{Sc} を区別して捕捉できるが PrP^C は捕捉しない、Ortho-Clinical Diagnostics社によって開発された抗核酸モノクローナル抗体（米国特許第60/434,627号明細書、米国特許第60/446,217号明細書）は、 PrP^{Sc} の核酸に対する関連性を示すもう一つの証拠である。

【0020】

罹患した脳から分離された PrP^{Sc} が、種々のグリカンとも関係していることが知られている。これらには、プリオンロッド中における1,4-結合のグルコース単位、スフィンゴ脂質、多糖類および PrP^{Sc} 凝集体中のその他の膜組織構成成分（Appel, 1999年、Klein, 1998年）ならびにプリオンアミロイドブラーク中の硫酸化プロテオグリカン（Snow, 1990年）が含まれ、硫酸ヘパリン抗体（抗HS）および硫酸ヘパリンプロテオグリカン抗体（抗HSPG）による結合が生じるという、免疫組織化学で開発されてきた特性が異常 PrP に関連することが、感染後70日という初期および疾病の間中ずっと示された（McBride, 1998年）。グリカンはまた、恐らく、 PrP^C から PrP^{Sc} への変換に核酸が参与する場合は異なるメカニズムを通して、細胞プリオンタンパク質をβ-シート立体構造に変える。 PrP^C から PrP^{Sc} への生体外変換および、プリオン伝染力再構成実験において、硫酸化グリカンが、変換を促進するか、伝染力をエスカレートさせることが示された（Wong, 2001年、Shaked, 2001a年、Diaz-Nido, 2002年）。ワーナーは、最近、組換え型GST： β ：完全な長さのプリオンおよびGST： β ：プリオン断片を用いて、組み換え型プリオンがヘパリンおよび硫酸ヘパリンに直接結合することを証明した（Warner, 2002年）。プリオン配列のペプチド領域23~52が、全てのHSおよびHSPG結合テストで陽性であった。ペプチドがヘパリンとの結合で完全な長さのプリオンと競合できなかったため、無傷の PrP^C にもう一つの主要なGAG結合サイトがあるかもしれないと著者

10

20

30

40

50

は示唆している。もう一つの興味ある観察としては、プラスミノーゲンが、脳由来の Pr P^{Sc}とは結合するが、Pr P^Cとは結合しないという事実が報告されている。プラスミノーゲンが Pr P^{Sc}と直接的相互作用を有することは証明されていないが、ヘパリンに対し親和性を有することが知られている領域である、プラスミノーゲンの Kringle 領域中に結合部があるのではないかと提案されている。もう一つの注目すべき観察は、種々異なる種(ウシおよびブタ)または、種々異なる器官(肺、腎臓および腸)からの GAG が、プリオン結合に対し種々異なる親和性を示したという事実である。この親和性の相違は、プリオン配列自体に起因するものかもしれない。また、テストされた GAG 中の特定の糖単位の存在に依存するものであるのかもしれない。

【0021】

これらの観察に鑑み、ユニークな Pr P^{Sc} 立体構造または Pr P^{Sc} 関連分子へのペプチドの親和性によって、Pr P^{Sc} を選択的に捕捉するが Pr P^C は捕捉しないように設計された、いくつかのペプチドが提案された。これらは、プロテアーゼ前処理のない免疫沈降法によって、罹患した脳のホモジネートから Pr P^{Sc} を識別し捕捉する能力によってスクリーニングされたものである。

【0022】

〔(1)ヘパリン/硫酸ヘパリン結合領域ペプチド〕

ヘパリンや硫酸ヘパリン等のグリカン(GAG)は、Pr P^{Sc} アミロイド凝集体と関連していた。この関連性に対する親和性は、GAG : : Pr P^C より GAG : : Pr P^{Sc} でずっと高いので、グリカン結合領域として特徴づけられるペプチドを使用して、選択的に Pr P^{Sc} を捕捉し Pr P^C を捕捉しないようにすることが可能である。この理由から、ヘパリンまたは硫酸ヘパリン結合領域と呼ばれるペプチド：(1)カルボキシ末端フィブロネクチンの WQP P R A R I (Woods, 1993年, Hines, 1994年)、(2)アミロイド・タンパク質前駆体の N W C K R G R K Q C K T H (Small, 1994年)、(3)N-末端線維芽細胞成長因子(FGF)-1の N Y K K P K L (Lou, 1996年)および(4)ラミニン 1鎖のC-末端G-領域の K D F L S I E L V R G R V K (吉田, 1999年)が合成された。

【0023】

〔(2)「濃縮された」Kringleペプチド〕

Kringle 領域は、プラスミノーゲンを Pr P^{Sc} に選択的に結合させることに関与していた。Kringle 領域が、正に荷電したアミノ酸(たとえば Arg および Lys)が関与するヘパリン/硫酸ヘパリン結合活性(水野, 1994年)を有することが知られていた(Soeda, 1989年)。別の出版物では、プリオン配列中に保存された二つのトリペプチド「YYR」またはむしろ、提案された三つの非連続の「YYX」が、Pr P^{Sc} と相互作用するが、Pr P^C とは相互に作用しないことが見出された(Paramithiotis, 2003年、国際公開第0078344A1号パンフレット)。興味深いことに、ヒトのプラスミノーゲン配列中には、4つの Tyr - Arg - Gly 配列が、5つの Kringle 領域中4つ(Kringle 領域1中の Y(92)R(93)G(94), Kringle 領域3中の Y(264)R(265)G(266), Kringle 領域4中の Y(366)R(367)G(368)および Kringle 領域5中の Y(470)R(471)G(472))に存在していた。プラスミノーゲンには、K(19)K(20), R(61)K(62), K(77)K(78), R(153)Y(154), K(211)K(212), K(233)R(234), K(311)R(312), K(377)K(378), K(433)K(434), K(473)R(474), R(530)K(531), K(556)K(557), Y(614)K(615), R(644)K(645), R(712)Y(713), K(752)Y(753)等の16の Tyr - Lys または Arg - Tyr または Lys - Tyr または Arg - Lys または Lys - Arg または Lys - Lys 配列が存在していた。さらに、数個の離れた Tyr、Arg または Lys 残基が、Kringle ループに形成されたジスルフィドブリッジによって、相互に近づけられていた(図1)

10

20

30

40

50

。これらの観察に基づいて、恐らく、PrP^{Sc}複合体が関連するグリカンとの相互作用を介して、プラスミノゲンKringle領域中とプリオン配列中のアミノ酸(Tyr, ArgおよびLys)が、PrP^{Sc}への選択的結合に寄与するものと考えられた。この理由から、2つの「濃縮されたKringle」ペプチド(YRGRGRGRGRGRGRおよびYRGRYGYKGYGRGR)が合成された。

【0024】

〔(3)核酸結合ペプチド〕

核酸は、PrP^{Sc}凝集体と関連するもう一つの分子カテゴリーである。PrP^{Sc}を捕捉するのに、抗DNA抗体が有効に使用されてきた。ヒストンは、核DNAに結合することが知られている一群のタンパク質である。したがって、PrP^{Sc}の捕捉能力を評価するために、(1)H2B(21-41)のAQKKDGKKRKRSRKESYSIYV、(2)H3(1-21)のARTKQTARKSTGGKAPRKQLAおよび、(3)H4(2-24)のSGRGGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRLの3つのペプチドが合成された。

〔発明の概要〕

【0025】

本発明の目的は、TSE病関連の病原性プリオンタンパク質を単離し、濃縮し、モニターする非侵襲的な方法を提供することである。本発明は、いくつかのペプチドと、プリオン病の患畜と患者との脳ホモジネートからPrP^{Sc}を捕捉するこれらのペプチドの能力に関する。これらの8つのペプチドは、プリオン病に罹患していない個体からの細胞プリオンタンパク質を捕捉しない。本発明をサポートする証拠により、PrP^{Sc}が、研究対象の核酸やグリカン等の多くの他の分子に対する高い親和性と関連していることが証明された。この証拠により、上記の関連性が強く、PK消化処理に抵抗力を示すことおよび、そのような関連結合パートナーの認識を通して、PrP^{Sc}がペプチドによって容易に単離され得ることも証明された。

【0026】

本発明は、PrP^{Sc}の検出のための、PrP^{Sc}への高い親和性と関連するグリカンまたは核酸を介してPrP^{Sc}を捕捉するための上記ペプチドと、プリオン配列に対し特異性を有する任意の抗体との組み合わせの使用に関するものである。

【0027】

本発明のもう一つの態様は、好ましくは、病原性プリオンタンパク質と結合し、プリオンタンパク質の正常な細胞型とは結合しない上述のペプチドに関するものである。

【0028】

本発明のもう一つの態様は、関連するグリカンまたは核酸の高い親和性認識を介したPrP^{Sc}の検出のための上記ペプチドと、プリオン配列に対し特異性を有する抗体との組合せに関するものである。

【0029】

本発明のもう一つの態様は、生物学的薬剤の製造中におけるPrP^{Sc}の単離、精製、捕捉、除去および監視のための上記ペプチドに関するものである。

【0030】

本発明のもう一つの態様は、評価手順中における捕捉または検出段階のための上記ペプチドを含む、PrP^{Sc}の存在を決定するための組成物およびキットに関するものである。

【0031】

本発明のもう一つの態様は、病原性プリオンタンパク質の結合パートナーとしての高い親和性に関連するグリカンまたは核酸に対応して生じた、PrP^{Sc}抗体の存在を決定するための組成物およびキットに関するものである。

【0032】

本発明のさらにもう一つの態様は、抗PrP^{Sc}抗体、PrP^{Sc}と相互作用しおよび/または関連することのできる上記グリカンまたは核酸を使用した抗PrP^{Sc}抗体の生産ならびに、グリカン：：PrP^{Sc}または核酸：：PrP^{Sc}複合体およびプリオン病の感染の検

10

20

30

40

50

出における抗PrP^{Sc}抗体の使用に関するものである。

【0033】

本発明のもう一つの態様は、上記ペプチドの使用のための、グリカナーゼまたはヌクレアーゼ消化が関与する、厳しくないサンプル処理手順に関するものである。

【0034】

〔脳ホモジネート調合物〕

正常およびスクレーピーのハムスターの脳溶解物を、全脳組織ホモジネートを10% (w/v) 含んだPBS (リン酸緩衝生理食塩水) として、ボルチモア研究および教育財団 (Baltimore Research and Education Foundation) から得た。さらに、この溶解物に、5%のナトリウムデオキシコレートと5%のIgpal CA-630 (NP-40と同等) とをPBSに含ませてなる10Xの洗剤ホモジネート緩衝液 (1/10体積量) を加え、4 で1時間培養し、ついで、1,000gで10分間で遠心沈降処理した。得られた上澄みを集め、評価に使用した。

10

【0035】

正常およびBSEのウシの脳組織は、英国のVeterinary Laboratories Agency (VLA) から提供された。ヒトのvCJDとレービー小体型痴呆の脳組織は、英国のNational CJD Surveillance Unit (NCJDSU) から提供された。脳組織は、ハムスター脳ホモジネート調合物と同一の (または類似の) 方法で処理した。

20

【0036】

〔合成ペプチド〕

9つのペプチドを、ResGen (現在は、Invitrogen社の一部門) で合成し、あるいは、Upstate Group社から購入した。それぞれのペプチドのビオチンラベル付けを、アミノヘキサノイルスパーサー (K(Lc)) を持つC末端リジンで、または、アミノヘキサノイルスパーサー (AMCAP) を介してN末端で、行った。

ペプチドID	ペプチド配列	配列の起源
	供給元	
配列ID番号1:	WQPPRARI GK(Lc)-Biotin	フィブロネクチン
	ResGen	
配列ID番号2:	Biotin-AMCAP-NWCKRGRKQCKTH	アミロイドタンパク質前駆体
	ResGen	
配列ID番号3:	Biotin-AMCAP-NYKKPKL-G	線維芽細胞成長因子(FGF)-1
	ResGen	
配列ID番号4:	Biotin-AMCAP-KDFLSIELVRGRVK	ラミニンA鎖
	ResGen	
配列ID番号5:	YRGRYGRYGRG-K(Lc)-Biotin	「濃縮」Kringle-A
	ResGen	
配列ID番号6:	YRGRYGRYGRG-K(Lc)-Biotin	「濃縮」Kringle-B
	ResGen	
配列ID番号7:	AQKKDGKKRKRSRKESYSIYV-GGK(Lc)-Biotin	ヒトヒストン 2B
	Upstate	
配列ID番号8:	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA-GGK(Lc)-Biotin	ヒトヒストン 3
	Upstate	
配列ID番号9:	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRL-GSGSK(Lc)-Biotin	ヒトヒストン 4
	Upstate	
配列ID番号10:	Biotin-AMCAP-TIADRYRETAR	VP16タンパク質, HSV-2
	ResGen	

30

40

ビオチン化されたペプチドはPBS中に1mg/mLで溶解し、使用まで-20 で保存した。

【0037】

50

〔ビオチン化されたペプチドのストレプトアビジン磁気ビーズへの接合〕

0.5 mLのDynabeads (R) M-280 ストレプトアビジン (米国, ニューヨーク, Dynal Biotech社, Cat. # 112.06) をPBSで二回洗浄し、磁石 (Dynal Magnetic Particle Concentrator社, MPC) でこのビーズを緩衝液から単離した。100 μ gのペプチドと1 mLのPBSとをこの洗浄ビーズに添加した。回転付きの培養を37 $^{\circ}$ Cで1~2時間行った。MPCで緩衝液からビーズを単離し、1 mLのPBS (0.1% BSA) で二回洗浄した。洗浄中、室温で5分間回転を行った。ついで、ペプチドを接合したビーズを、1 mMビオチンの、0.1%のBSAを含む0.2 Mのトリス-塩酸, pH 8.0の液中で、37 $^{\circ}$ Cで2時間、ブロックした。ついで、ビーズを1 mLのPBS (0.1%のBSA) により2回洗浄し、1 mLのPBS (0.1%のBSA, 1%のTween 20) で一回洗浄し、毎回、室温で10分間培養した。その後、ビーズを、1 mLのPBS (0.1% BSA) で一回洗浄し、ついで、1 mLのPBS (0.05%のアジ化ナトリウム) 中に4

10

【0038】

〔プロテイナーゼK消化〕

脳溶解物のPK消化の条件：脳ホモジネートを、非イオン性洗剤を使用しまたは使用しないで、PBS緩衝液中に懸濁した。全ホモジネータンパク質の濃度は、僅か2.5 mg/mLであった。PK (米国, インディアナ州, Roche Diagnostics社, Cat. # 1373196) を添加して、50 μ g/mLの最終濃度にした。37 $^{\circ}$ Cで0.5~1時間掛けて培養を行った。Pefabloc SC (米国, インディアナ州, Roche Diagnostics社, Cat. # 1585916) を添加して消化を停止し、4 mMの最終濃度にした。

20

【0039】

〔PrP^{Sc}の免疫沈降 (IP)、非還元電気泳動および免疫プロット検出〕

ペプチド接合磁力ビーズを使用し、免疫沈降によって脳ホモジネートからPrP^{Sc}を捕捉した。このIP手順は、次のプロトコルからなっていた：50 μ Lのペプチド接合ビーズを、全部で1 mLのIP緩衝液 (3%のTween 20と3%のIgpal CA-630を含むPBS) 中、PK処理したまたはPK処理していない脳ホモジネートと混合し、25 $^{\circ}$ C下、2.5時間、回転付きで培養する。MPCデバイスを使用してビーズを分離し、IP洗浄用緩衝液 (2%のTween 20と2%のIgpal CA-630を含むPBS) でボルテックス (vortexing) することにより、30秒間ずつ3回ビーズを洗浄する。ビーズをNuPAGEサンプル緩衝液と共に、10~15分間加熱して、捕捉されたPrP^{Sc}を溶出する。IP捕捉物からの溶出サンプルを、4~12%のNuPAGE (R) Bis-Tris Gel (米国, カリフォルニア州, Invitrogen社, Cat. # NP0302) にロードして、200 Vで、45分間、非還元電気泳動に供した。免疫プロット手順を以下のように実行した：ゲル中の分離タンパク質を、30 V、60分間で、0.2 μ mのPVDF膜 (Invitrogen, Cat # LC2002) に移動させる。この膜組織を、BlockerTM Casein含有TBS (0.05%のTween 20) (米国, イリノイ州, Pierce Chemical社, Cat. # 37532) で、振盪付きで、25 $^{\circ}$ C下1時間かけるかまたは4 $^{\circ}$ Cで一昼夜かけてブロックする。一次抗体として、1:3,000希釈の3F4 (米国, マサチューセッツ州, Signet社, Cat. # 9620-02) または、1:5,000希釈の6H4 (スイス, Prionics社, Cat. # 01~011) を使用してPrP^{Sc}を検出する。25 $^{\circ}$ C下、振盪付きで1時間かけて、10%のBlockerTMカゼイン含有TBS T緩衝液 (25 mMのTris-Cl, 0.2 MのNaCl, 0.2%のTween 20, pH 8.0) に一次抗体を希釈した液で膜組織を培養する。振盪付きで3回 \times 5分間、TBS T緩衝液で洗浄する。50%のBlockerTMカゼイン含有TBS T緩衝液中1:10,000~1:30,000に希釈した、ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合ヤギポリクローナル抗マウスIgG (H+L) (米国, ペンシルベニア州, J

30

40

50

ackson ImmunoResearch Laboratories社, Cat. # 115-035-003)で、膜組織を、25℃下、振盪付きで1時間かけて培養する。振盪付きで6回×5分間、TBST緩衝液で洗浄する。ECL化学ルミネセンス基質(米国、ニュージャージー州, Amersham Biosciences社, Cat. # RPN2109)または、SuperSignal West Dura化学ルミネセンス基質(Pierce社)を膜組織に添加し、5分間現像する。BioMax MR-2フィルム(米国、ニューヨーク州, Kodak社)またはChemidoc Gel Documentation System(米国, カリフォルニア州, Bio-Rad社)へ曝露して像を得る。

〔利点〕

【0040】

本発明では、グリカン、核酸等の、PrP^{Sc}複合体中の高い親和性に関連する分子を認識することにより、PrP^{Sc}を捕捉するためにペプチドを使用する。これらの分子がPrP^{Sc}だけに関連し、PrP^Cには関連しないと言う厳密な関連性により、本発明は、PK消化やその他のタンパク質変性手順を必要としないで、PrP^{Sc}を検出できる非侵襲的な手段を提供する。条件が穏やかになるため、病原性プリオンタンパク質の元々の構造と立体構造とが保存され、これによって、過酷なサンプル処理によるPrP^{Sc}の生成を最小限に抑え、真のPrP^{Sc}の存在を決定する機会が提供されるものと期待される。

【0041】

合成ペプチドの使用は、その結合が特異的であり、固相への直接コーティングで容易に取り扱うこともでき、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)等の所与の試薬に、接合、リンクして、信号を発することができ、あるいは、その他の所望の診断評価フォーマットで採用することができる利益を与える。

〔引用文献〕

【0042】

アグッチ・エー(Aguzzi A), フィッシャー・エムビー(Fischer MB), 「血清と血漿中のプリオン-結合活動(Prion-Binding Activity in Serum and Plasma)」, 2001年, US 20010053533A1

【0043】

アップル・ティーアール(Appel TR), ドウムピタック・シー(Dumpitak C), マッシーセン・ユー(Matthiesen U), リーズナー・ディー(Riesner D), 「プリオンロッドは、不活性な多糖類スキャフォールドを含む(Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold.)」, 1999年, Biol Chem 380(11):1295-306

【0044】

アーノルド・ジェイイー(Arnold, JE), ティプラー・シー(Tipler C), ラズロ・エル(Laszlo L), ホープ・ジェイ(Hope J), ランドン・エム(Landon M), メイヤー・アールジェイ(Mayer RJ), 「スクレーピー感染マウスの脳中の後期末ソーム様オルガネラにおけるプリオンタンパク質の異常なイソ型の蓄積(The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain.)」, 1995年, J. Pathol. 176:403-411

【0045】

バーナード・ジー(Barnard G), ヘルミック・ビー(Helmick B), マッドン・エス(Madden S), ギルボーン・シー(Gilbourne C)およびペイテル・アール(Patel R), 「BSEの診断テストとして、差分抽出とDELFI Aとを用いたウシの脳組織中のプリオンタンパク質の測定(The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE)」, Luminescence, 2000年, 15:357362

【0046】

ビレイ・イーディー(Belay ED), 「人体における伝達性海綿状脳症(Transmissible spongiform encephalopathies in humans)」, 1999年, Annu. Rev. Microbiol. 53:28

10

20

30

40

50

3-314.

【 0 0 4 7 】

ビフィンガー・ケイ(Biffiger K), ツバルト・ディー(Zwald D), カウフマン・エル(Kaufmann L), プリナー・エイ(Briner A), ナイキ・アイ(Nayki I), ピュッコ・エム(Purro M), ボッチャー・エス(Bottcher S), シュトゥルックマイヤー・ティー(Struckmeyer T), シャラー・オー(Schaller O), マイヤー・アール(Meyer R), ファッツァー・アール(Fatzer R), ツルブリッゲン・エイ(Zurbriggen A), スタック・エム(Stack M), モーゼル・エム(Moser M), オッシュ・ビー(Oesch B), クブラー・イー(Kubler E), 「脳ホモジネートの PrP (Sc) の検出のための発光イムノアッセイの検証(Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate)」, 2002年, J Virol Methods 101(1-2):79-84.

10

【 0 0 4 8 】

ボルトン・ディーシー(Bolton DC), 「プリオンとタンパク質: 立体構造間の区別(Prions and proteins: distinguishing between conformations)」, 2001年, The Lancet 358(9277):164-165

【 0 0 4 9 】

ブラウン・ピー(Brown P), カタラ・エフ(Cathala F), ラウベルタス・アールヘフ(Raubertas RF), ガジュセク・ディーシー(Gajdusek DC), カスターニュ・ピー(Castaigne P), 「クロイツフェルト・ヤコブ病の疫学: フランスにおける15年間の研究の結論および世界文献のレビュー(The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15 year investigation in France and review of the world literature)」, 1987年, Neurology 37:895-904.

20

【 0 0 5 0 】

ブラウン・ピー(Brown P), 「ヒトの健康に対するウシの海綿状脳症「狂牛病」の危険性(The risk of bovine spongiform encephalopathy ("mad cow disease") to human health)」, JAMA 1997; 278: 1008-1011

【 0 0 5 1 】

ブルース・エムイー(Bruce ME), ウィル・アールジー(Will RG), アイアンサイド・ジェイダブリュー(Ironside JW), マコーネル・アイ(McConnell I), ドラモンド・ディー(Drummond D), サティ・エイ(Suttie A), マッカードル・エル(McCardle L), クリー・エイ(Chree A), ホープ・ジェイ(Hope J), バークETT・シー(Birkett C), カウセンス・エス(Cousens S), フレーザー・エイチ(Fraser H)およびボストック・シージェイ(Bostock CJ), 「マウスへの伝達は、「新しい変異型」CJDが、BSE物質によって引き起こされることを示している。(Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent.)」, 1997年, Nature 389:498-501

30

【 0 0 5 2 】

コーギー・ピーダブリュー(Caughey BW), ドン・エイ(Dong A), バート・ケイエス(Bhatt KS), エルンスト・ディー(Ernst D), ヘイズ・エスエフ(Hayes SF), コーギー・ダブリューエス(Caughey, W.S.), 「赤外分光分析による水中のスクレーピー関連タンパク質 PrP27-30の二次的構造分析(Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP2730 in water by infrared spectroscopy)」, 1991年, Biochemistry 30:76727680.

40

【 0 0 5 3 】

コーギー・ビー(Caughey B)およびコシスコ・ディーエイ(Kocisko DA.), 「核酸は共犯者?(A nucleic-acid accomplice?)」, 2003年, Nature Oct 16;425(6959):673-4

【 0 0 5 4 】

チャンドラー・アール(Chandler R), 「スクレーピーの脳物質で生み出されたマウスの脳症(Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material)」, 1961年, Lancet 1:1378-1379

【 0 0 5 5 】

50

コーエン・エフィー (Cohen FE), プルジナー・エスビー (Prusiner SB.), 「プリオンタンパク質の病理学的立体構造 (Pathologic conformations of prion proteins)」, 1998年, Annu Rev Biochem 67:793-819

【0056】

コルデイロ・ワイ (Cordeiro Y), マチャド・エフ (Machado F), ジュリアーノ・エル (Juliano L), ジュリアーノ・エムエー (Juliano MA), プレンタニ・アールアール (Brentani RR), フォグエル・ディー (Foguel D), シルヴァ・ジェイエル (Silva JL), 「DNAが細胞プリオンタンパク質をβシート立体構造に変え、プリオンペプチドの凝集を禁止する (DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation)」, 2001年, J Biol Chem. 276(52):49400-9.

10

【0057】

クイエ・ジェイ (Cuille J), シェレ・ピーエル (Chelle PL), 「La maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable?」, 1936年, C. R. Acad. Sci. 203, 1552-1554

【0058】

デロルト・エヌディー (Deleault ND), ルカッセン・アールダブリュー (Lucassen RW) およびスパッタポン・エス (Supattapone S), 「RNA分子がプリオンタンパク質の変換を刺激する (RNA molecules stimulate prion protein conversion.)」, 2003年, Nature Oct 16;425(6959):717-20

【0059】

ディアズ・ニド・ジェイ (Diaz-Nido J.), ワンドセル・エフ (Wandosell F.) およびアビラ・ジェイ (Avila J), 「神経変性病における、グリコサミノグリカンとβ-アミロイド、プリオンならびにペプチド (Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases.)」, 2002年, J Biol Chem Jul;23(7):1323-32

20

【0060】

FDA および CBER, 米国保健社会福祉省 (2001) (U.S. Department of Health and Human Services (2001)) IV, 「産業ガイダンスにおけるドナー保留についての勧告: 血液および血液産物による、クロイツフェルト-ヤコブ病 (CJD) と変異型クロイツフェルトヤコブ病 (vCJD) の感染危険の可能性を減少させるための改訂防止策 (RECOMMENDATIONS FOR DONOR DEFERRAL in Guidance for Industry: Revised Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products)」

30

【0061】

ファーガソン・エヌエム (Ferguson NM), ガーニー・エイシー (Ghani AC), ドネリイ・シーエイ (Donnelly CA), ハゲナース・ティージェイ (Hagenaars TJ), アンダーソン・アールエム (Anderson RM), 「英国のヒツジ群の BSE 感染の可能性によるヒトの健康に対するリスクの推定 (Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock.)」, 2002年, Nature 415(6870):420-4

【0062】

フィッシャー・エムビー (Fischer MB), ロッケル・シー (Roedel C), パリチェック・ピー (Parizek P), シュヴァルツ・エイチピー (Schwarz HP), アグッチ・エイ (Aguzzi A), 「病気関連プリオンタンパク質のプラスミノゲンへの結合 (Binding of disease-associated prion protein to plasminogen.)」, 2000年, Nature 408:479-83.

40

【0063】

フォスター・ジェイディー (Foster JD), ホープ・ジェイ (Hope J), マコーネル・アイ (McConnell I), ブルース・エム (Bruce M), フレーザー・エイチ (Fraser H), 「ウシの海綿状脳症の、ヒツジ、ヤギおよびマウスへの感染 (Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice.)」, 1994年, Ann N Y Acad Sci 724:300-3.

50

【 0 0 6 4 】

ガビゾン・アール(Gabizon R), マッキンレー・エムピー(McKinley MP), グロス・ディー(Groth D), プルジナー・エスビー(Prusiner SB), 「スクレーピープリオン伝染性の免疫親和性、精製および無効化(Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity.)」, 1988年, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 66176621

【 0 0 6 5 】

ガジュセク・ディーシー(Gajdusek DC), ギブズ・シージェイジェイ(Gibbs CJJ), アルパース・エムピー(Alpers MP), 「チンパンジーに対するクル様症候群の実験的感染(Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees.)」, 1966年, Nature 209:794-796

10

【 0 0 6 6 】

ガジュセク・ディーシー(Gajdusek DC), 「非従来型ウイルス、その起源およびクルの消滅(Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru.)」, 1977年, Science 197:94360

【 0 0 6 7 】

ギブズ・シージェイジェイ(Gibbs CJJ), ガジュセク・ディーシー(Gajdusek DC), アッシャー・ディーエム(Asher DM), アルパース・エムピー(Alpers MP), ベック・イー(Beck E), ダニエル・ピーエム(Daniel PM), マシューズ・ダブリュービー(Matthews WB), 「クロイツフェルト - ヤコブ病(海綿状脳症): チンパンジーへの感染(Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee.)」, 1968年, Science 161, 388-389

20

【 0 0 6 8 】

プルジナー・エスビー(Prusiner SB), ハドロウ・ダブリュージェイ(Hadlow WJ) (編者), 「神経系の遅い伝達性の疾患(Slow transmissible diseases of the nervous system.)」, Volume 2. New York: Academic Press; p. 87-110.における、ギブズ・シージェイジュニア(Gibbs CJ Jr), ガジュセク・ディーシー(Gajdusek DC), アミックス・エイチ(Amyx H), 「クロイツフェルト - ヤコブ病およびクルのウイルスにおける種の変異(Strain variation in the viruses of Creutzfeldt-Jakob disease and kuru.)」, 1979年

【 0 0 6 9 】

ヒル・エイエフ(Hill AF), ザイドラー・エム(Zeidler M), アイアンサイド・ジェイ(Ironside J), コリンジ・ジェイ(Collinge J), 「扁桃の生検による新しい変異型クロイツフェルトヤコブ病の診断(Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy.)」, 1997年, Lancet 349(9045):99-100

30

【 0 0 7 0 】

ヒリアー・シーイー(Hillier CE), サーモン・アールエル(Salmon RL), ニール・ジェイダブリュー(Neal JW), ヒルトン・ディーエイ(Hilton DA), 「変異型クロイツフェルトヤコブ病の過小確認の可能性: 組織的研究(Possible underascertainment of variant Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic study.)」, 2002年, J Neurol Neurosurg Psychiatry 72(3):304-9

40

【 0 0 7 1 】

ハインズ・ケイエル(Hines KL), クルカルニ・エイビー(Kulkarni AB), マッカーシー・ジェイビー(McCarthy JB), チアン・エイチ(Tian H), ワード・ジェイエム(Ward JM), クリスト・エム(Christ M), マッカートニー・フランシス・エヌエル(McCartney-Francis NL), フルフト・エルティー(Furcht LT), カールソン・エス(Karlsson S), ワール・エスエム(Wahl SM), 「合成フィブロネクチン・ペプチドは、トランスフォーミング成長因子1ノックアウト・マウス中の炎症性細胞浸潤を妨害する(Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor beta 1 knockout mice.)」, 1994年, Proc Natl Acad Sci U S A May 24;91(11):5187-91.

50

【 0 0 7 2 】

ホラダ・ケイ(Holada K), シマック・ジェイ(Simak J), フォスタル・ジェイジー(Vostal JG), 「輸血による B S E の感染(Transmission of BSE by blood transfusion.)」, 2 0 0 0 年, Lancet 356(9243):1772

【 0 0 7 3 】

ホープ・ジェイ(Hope J), モートン・エルジェイディー(Morton LJD), ファーカー・シーエフ(Farquhar CF), マルソープ・ジー(Multhaup G), ベイルーサー・ケイ(Beyreuther K), キンバーリン・アールエイチ(Kimberlin RH), 「スクレーピー関連のフィブリル(SAF)の主要なポリペプチドのサイズ、電荷分布およびN末端タンパク質配列は、正常な脳タンパク質(PrP)について予測されるサイズ、電荷分布およびN末端タンパク質配列と同一である(The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP))」, 1 9 8 6 年, EMBO J. 5, 25912597.

10

【 0 0 7 4 】

ホリウチ・エム(Horiuchi M), コーギー・ビー(Caughey B), 「プロテアーゼ耐性状態への変換は、正常なプリオンタンパク質の、局所的領域を経由する、スクレーピー型への特異的結合により開始される(Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state.)」, 1 9 9 9 年, EMBO J 18(12):3193-203.

【 0 0 7 5 】

ホーウィッチ・エイエル(Horwich AL), ワイスマン・ジェイエス(Weissman JS), 「致命的な立体構造 - プリオン病におけるタンパク質の折り畳みの間違い(Deadly Conformations Protein Misfolding in Prion Disease.)」, 1 9 9 7 年, Cell, 89:499510

20

【 0 0 7 6 】

ヒューストン・エフ(Houston F), 「ヒツジの輸血による B S E の感染(Transmission of BSE by blood transfusion in sheep.)」, 2 0 0 0 年, Lancet 356(9234):999-1000

【 0 0 7 7 】

ハンター・エヌ(Hunter N), フォスター・ジェイ(Foster J), チョン・エイ(Chong A), マカッチャン・エス(McCutcheon S), パーナム・ディー(Parnham D), イートン・エス(Eaton S), マッケンジー・シー(MacKenzie C), ヒューストン・エフ(Houston F), 「輸血によるプリオン病の感染(Transmission of prion diseases by blood transfusion.)」, 2 0 0 2 年, J Gen Virol Nov;83(Pt 11):2897-905

30

【 0 0 7 8 】

ジャクソン・ジーエス(Jackson GS), ホッツ・エルエル(Hosszu LL), パワー・エイ(Power A), ヒル・エイエフ(Hill AF), ケニー・ジェイ(Kenney J), サイビル・エイチ(Saibil H), クレーヴン・シージェイ(Craven CJ), ワルト・ジェイピー(Waltho JP), クラーク・エイアール(Clarke AR), コリンジ・ジェイ(Collinge J), 「天然の立体構造とフィブリロジェニックな立体構造との間における単量体型のヒトプリオンタンパク質の可逆的な変換(Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations.)」, 1 9 9 9 年, Science 283(5409):1935-7.

40

【 0 0 7 9 】

ケリングス・ケイ(Kellings K), マイヤー・エヌ(Meyer N), ミレンダ・シー(Miranda C), プルジナー・エスピー(Prusiner SB), リーズナー・ディー(Riesner D), 「改良リターンリフォーカシングゲル電気泳動による、精製スクレーピープリオン調合物中の核酸のさらなる解析(Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis.)」, 1 9 9 2 年, J. Gen. Virol. 73, 10251029.

【 0 0 8 0 】

キンバーリン・アールエイチ(Kimberlin RH), コール・エス(Cole S), ウォーカー・シーエイ(Walker CA), 「ラットおよびハムスターへの感染における、マウス・スクレーピー

50

一の単一株への一時的および永久的変化(Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters.)」, 1987年, J Gen Virol 68:1875-81.

【0081】

キンバーリン・アールエイチ(Kimberlin RH), ウォーカー・シーエイ(Walker CA), フレーザー・エイチ(Fraser H), 「マウススクレーピーの種々異なる株のゲノムの同一性が、ハムスター中で発現され、マウス中の再分離で保存される(The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice.)」, 1989年, J Gen Virol 70:2017-25.

【0082】

クライン・ティーアール(Klein TR), キルシュ・ディー(Kirsch D), カウフマン・アール(Kaufmann R)およびリースナー・ディー(Riesner D), 1998年, Biol. Chem. 379:655-666

【0083】

コース・シー(Korth C), スチーリ・ビー(Stierli B), シュトライト・ビー(Streit P), モーゼル・エム(Moser M), シャラー・オー(Schaller O), フィッシャー・アール(Fischer R), シュルツ・シェーファー・ダブリュー(Schulz-Schaeffer W), クレツシュマー・エイチ(Kretzschmar H), レーバー・エイ(Raeber A), ブラウン・ユー(Braun U), エーレンスベルガー・エフ(Ehrensperger F), ホーネマン・エス(Hornemann S), グロックスビューバー・アール(Glockshuber R), リーク・アール(Riek R), ビレター・エム(Billeter M), プュートリッヒ・ケイ(Wuthrich K), オッシュ・ビー(Oesch B), 「モノクローナル抗体によって定義される、プリオン(PrP^{Sc})に対し特異性を有するエピトープ(Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody.)」, 1997年, Nature 390(6655):74-7

【0084】

ラスメザス・シーエル(Lasmezas CI), デズリー・ジェイビー(Deslys JP), デマイメイ・アール(Demaimay R), アジュー・ケイティー(Adjou KT), ラムーリー・エフ(Lamoury F)等, 「マカクへのBSEの感染(BSE transmission to macaques.)」, 1996年, Nature 381:74344

【0085】

ルオ・ワイ(Luo Y), ガブリエル・ジェイエル(Gabriel JL), ワング・エフ(Wang F), ジャン・エックス(Zhan X), マシアグ・ティー(Maciag T), カン・エム(Kan M), マッキーン・ダブリューエル(McKeehan WL), 「分子モデリングと欠失突然変異生成が、線維芽細胞成長因子-1の構造的統合性における核転移配列を複雑にする(Molecular modeling and deletion mutagenesis implicate the nuclear translocation sequence in structural integrity of fibroblast growth factor-1.)」, 1996年, J Biol Chem. Oct 25;271(43):26876-83.

【0086】

マイセン・エム(Maissen M), ロッケル・シー(Roeckl C), マーカス・ジー(Markus G), ゴールドマン・ダブリュー(Goldman W), アグッチ・エイ(Aguzzi A), 「プラスミノーゲンは、複数の種の病気関連プリオンタンパク質に結合する(Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species.)」, 2001年, Lancet 357:2026-8.

【0087】

マヌエリディス・イーイー(Manuelidis EE), キム・ジェイエイチ(Kim JH), メリカンガス・ジェイアール(Mericangas JR), マヌエリディス・エル(Manuelidis L), 「人血から動物へのクロイツフェルト-ヤコブ病の感染(Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood.)」, 1985年, Lancet 2:89697

【0088】

マクブライド・ピーエイ(McBride PA), ウィルソン・エムアイ(Wilson MI), エイケレ

10

20

30

40

50

ンブーム・ピー(Eikelenboom P), タンストール・エイ(Tunstall A), ブルース・エムイー
ー(Bruce ME)「スクレーピーに感染したマウスの培養期間中ずっと、硫酸ヘパランプロテ
オグルカンが、アミロイドプラークと神経解剖学的な目標PrPの病状に関連する(Hepar
an Sulfate Proteoglycan is Associated with Amyloid Plaques and Neuroanatomically
Targeted PrP Pathology throughout the Incubation Period of Scrapie-Infected Mic
e.)」, 1998年, Experimental Neurol. 149:447-454

【0089】

マックゴウアン・ジェイピー(McGowan JP), 「ヒツジのスクレーピー(Scrapie in she
ep.)」, 1922年, Scott. J. Agric. 5:36575

【0090】

マイヤー・アールケイ(Meyer RK), マッキンレー・エムピー(McKinley MP), ボウマン
・ケイエイ(Bowman KA), ブラウンフェルト・エムピー(Braunfeld MB), バリー・アール
エイ(Barry RA), プルジナー・エスビー(Prusiner SB), 「細胞プリオンタンパク質およ
びスクレーピープリオンタンパク質の分離と特性(Separation and properties of cellul
ar and scrapie prion proteins.)」, 1986年, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:23
102314.

【0091】

ミズノ・ケイ(Mizuno K), イノウエ・エイチ(Inoue H), ハギヤ・エム(Hagiya M), シ
ミズ・エス(Shimizu S), ノセ・ティー(Nose T), シモヒガシ・ワイ(Shimohigashi Y),
ナカムラ・ティー(Nakamura T), 「ヘアピンループと2次Kringle領域が、肝細胞
成長因子のヘパリン結合と生物学的活性の必須のサイトである(Hairpin loop and seco
nd kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activit
y of hepatocyte growth factor.)」, 1994年, J Biol Chem. Jan 14;269(2):1131-6
. Plasminogen

【0092】

モイナー・ジェイ(Moynagh J), シンメル・エイチ(Schimmel H), 「ウシの伝達性海綿
状脳症の診察のための諸テストの評価(The evaluation of tests for the diagnosis of
Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines (8 July 1999))」, 1999年
7月8日, <http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12en.html>.

【0093】

ナラング・エイチケイ(Narang HK), 「海綿状脳症物質の性質の批評的総説: プリオン
説対ウイルス説(A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy
agent: prion theory versus virus theory.)」, 2002年, Exp Biol. Med. (Maywo
d) 227(1):4-19

【0094】

オローク・ケイアイ(O'Rourke KI), バズラー・ティーヴィー(Baszler TV), ベッサー
・ティーイー(Besser TE), ミラー・ジェイエム(Miller JM), カトリップ・アールシー(C
utlip RC), ウェルズ・ジーエイ(Wells GA)等, 「第三眼瞼リンパ系組織の免疫組織化学
によるスクレーピーの臨床前診断(Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistoch
emistry of third eyelid lymphoid tissue.)」, 2000年, J Clin Microbiol 38:32
54-9.

【0095】

パン・ケイエム(Pan KM), ボールドウィン・エム(Baldwin M), グエン・ジェイ(Nguyen
J), ガセット・エム(Gasset M), セルバン・エイ(Serban A), グロス・ディー(Groth D,
) , メールホーン・アイ(Mehlhorn I), フワン・ゼット(Huang Z), フレッタリック・アール
ジェイ(Fletterick RJ), コーエン・エフィー(Cohen FE), プルジナー・エスビー(Prus
iner SB), 「スクレーピープリオンタンパク質の形成における、螺旋形状からシート形状
への変換(Conversion of -helices into -sheets features in the formation of the sc
rapie prion proteins.)」, 1993年, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10962-10966

【 0 0 9 6 】

パラミシオチス・イー(Paramithiotis E)等, 「病的に誤って折り畳まれた立体構造に選択的なプリオンタンパク質エピトープ(A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation)」, 2003年, Nat Med Jul;9(7):893-9

【 0 0 9 7 】

パリチェク・ピー(Parizek P), ロックル・シー(Roeckl C), ウェーバー・ジェイ(Weber J), フレッシヒ・イー(Flechsigg E), アグッチ・エイ(Aguzzi A), レーバー・エイジェイ(Raeber AJ), 「一次リンパ細胞と神経細胞における細胞プリオンタンパク質の生成率と脱落の類似性(Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells.)」, 2001年_

10

【 0 0 9 8 】

パティソン・アイ, 「ヤギへのスクレーピーの感染(Transmission of scrapie to the goat.)」, 1957年, Lancet 272:104-105.

【 0 0 9 9 】

ブルジナー・エスピー(Prusiner SB), 「新規な伝染性のタンパク性粒子がスクレーピーを引き起こす(Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.)」, 1982年, Science (1982) 216:13644

【 0 1 0 0 】

レイモンド・ジージェイ(Raymond GJ)等, 「慢性消耗性疾患に対するヒト、ウシおよびヒツジの感染性を制限する分子バリアの証拠(Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease.)」, 2000年, EMBO J Sept 1; 19(17): 4425-30

20

【 0 1 0 1 】

サファール・ジェイ(Safar J), ウィル・エイチ(Wille H), イトリ・ヴィー(Itri V), グロス・ディー(Groth D), セルバン・エイチ(Serban H), トルチャ・エム(Torchia M), コーエン・エフイー(Cohen FE), ブルジナー・エスピー(Prusiner SB), 「異なる立体構造を有するPrP(Sc)分子を持つ8つのプリオン株(Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations.)」, 1998年, Nat. Med. 4(10):1157-65

【 0 1 0 2 】

シャラー・オー(Schaller O), ファッツァー・アール(Fatzer R), スタック・エム(Stack M), クラーク・ジェイ(Clark J), クーリー・ダブリュー(Cooley W), ビフィガー・ケイ(Biffiger K), エグリ・エス(Egli S), ドーヘル・エム(Doherr M), ヴァンデヴェルデ・エム(Vandeveldede M), ハイム・ディー(Heim D), オッシュ・ビー(Oesch B), モーゼル・ピー(Moser M), 「ウシのPrP(Sc)の検出のウエスタン免疫ブロット手順の検証と牛海綿状脳症(BSE)の診断のための急速調査方法としてのその使用(Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE).)」, 1999年, Acta Neuropathol (Berl) 98(5):437-43.

30

【 0 1 0 3 】

シェークト・ジーエム(Shaked GM), マイナー・ゼット(Meiner Z), アブラハム・アイ(Avraham I), タラブロス・アール(Taraboulos A), ガビゾン・アール(Gabizon R), 「可溶化されたプロテアーゼ耐性PrPとプリオンロッドの非タンパク質構成要素からのプリオン伝染力の再構築(Reconstitution of Prion Infectivity from Solubilized Protease-resistant PrP and Nonprotein Components of Prion Rods.)」, 2001年, J. Biol. Chem. 276(17):14324-14328

40

【 0 1 0 4 】

シェークト・ジーエム(Shaked GM), シェークト・ワイ(Shaked Y), カリブ・インバル・ゼット(Kariv-Inbal Z), ハリミ・エム(Halimi M), アブラハム・アイ(Avraham I), ガビゾン・アール(Gabizon R), 「プリオン病に感染した動物とヒトの尿中に、プロテアー

50

ゼ耐性プリオンタンパク質イソ型が存在する(A Protease-resistant Prion Protein Isoform Is Present in Urine of Animals and Humans Affected with Prion Diseases)」, 2001年, J. Biol. Chem., 276(34):31479-82

【0105】

シング・エスエル(Shyng SL), ホイザー・ジェイイー(Heuser JE), ハリス・ディーエイ(Harris DA), 「アグリコ脂質で固定されたプリオンタンパク質は、クラスリンで被覆されたピットにより取り込まれる(Aglycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits.)」, 1994年, J. Cell Biol. 125:123950

【0106】

スモール・ディーエイチ(Small DH), ヌルコム・ヴィー(Nurcombe V), リード・ジー(Reed G), クラリス・エイチ(Clarris H), モイア・アール(Moir R), ベイルーサー・ケイ(Beyreuther K), マスターズ・シーエル(Masters CL), 「アルツハイマー病のアミロイドタンパク質前駆体のヘパリン結合領域が、神経突起の伸張の規制に参与している(A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth.)」, 1994年, J Neurosci. Apr; 14(4):2117-27

【0107】

スノー・エイディー(Snow AD), 「ゲルストマン - シュトロイスラー症候群、クロイツフェルト - ヤコブ病およびスクレーピーのプリオンタンパク質アミロイドプラークに対する硫酸ヘパランプロテオグリカンの免疫学的局在決定(Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Strausler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie.)」, 1990年, Lab Invest. 63(5):601-1

【0108】

ソエダ・エス(Soeda S), オオキ・エイチ(Ohki H), シメノ・エイチ(Shimeno H), ナガマツ・エイ(Nagamatsu A), 「プラスミノーゲンのヘパリンへの結合のさらなる特徴付け: リジン残基の関与の証拠(Further characterization of the binding of plasminogen to heparin: evidence for the involvement of lysine residues.)」, 1989年, Biochim Biophys Acta. Nov 9;999(1):29-35. Plasminogen

【0109】

スイートニッキ・ダブリュー(Swietnicki W), モリラス・エム(Morillas M), チェン・エスジー(Chen SG), ガンベッチ・ピー(Gambetti P), スレビッチ・ダブリューケイ(Surewicz WK), 「組み換え型ヒトプリオンタンパク質 huPrP⁹⁰⁻²³¹ の凝集とフィブリル化(Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP⁹⁰⁻²³¹)」, 2000年, Biochemistry 39(2):424-31.

【0110】

タラブロス・エイ(Taraboulos A), セルバン・ディー(Serban D), プルジナー・エスピー(Prusiner SB), 「スクレーピープリオンタンパク質は、持続的に感染させられた培養細胞の細胞質に蓄積する(Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells.)」, 1990年, J. Cell. Biol. 110:211732

【0111】

タテイシ・ジエイ, 「ヒトの血液および尿からマウスへのクロイツフェルト - ヤコブ病の感染(Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice.)」, 1985年, Lancet 2:1074

【0112】

テリング・ジーシー(Telling GC), スコット・エム(Scott M), マストリアンニ・ジェイ(Mastrianni J), ガビゾン・アール(Gabizon R.), トルチャ・エム(Torchia M), コーエン・エフィー(Cohen FE), デアーモンド・エスジェイ(DeArmond SJ), プルジナー・エスピー(Prusiner SB), 「ヒトおよびキメラの PrP 導入遺伝子を発現するマウス中のプリオンの伝播には、細胞 PrP と他のタンパク質との相互作用が関与する(Prion propaga

10

20

30

40

50

tion in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein.)」, 1995年, Cell 83:7990.

【0113】

ヴァレロン・エイジェイ(Valleron AJ), ボエレ・ピーワイ(Boelle PY), ウイル・アール(Will R), セスブロン・ジェイワイ(Cesbron JY), 「英国のvCJDの年齢特徴に基づく、流行規模と潜伏期間との推定(Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom.)」, 2001年, Science 294(5547):1726-8

【0114】

ウォズワース・ジェイディー(Wadsworth JD), ジョイナー・エス(Joiner S)等, 「高感度免疫ブロット分析法を使用した、変異型クロイツフェルトヤコブ病におけるプロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の組織分布(Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay.)」, 2001年, Lancet 358(9277):171-80

【0115】

ワナー・アールジー(Warner RG), ハント・シー(Hundt C), ワイス・エス(Weiss S), ターンブル・ジェイイー(Turnbull JE), 「細胞プリオンタンパク質中の硫酸ヘパラン結合サイトの識別(Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein.)」, 2002年, J Biol Chem. May 24;277(21):18421-30

【0116】

ウェルズ・ジーエイエイチ(Wells GAH), スコット・エイシー(Scott AC), ジョンソン・シーティー(Johnson CT), ガニング・アールエフ(Gunning RF), ハンコック・アールデイー(Hancock RD)等, 「ウシにおける新規な進行性海綿状脳症(A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.)」, 1987年, Vet. Rec. 31:41920

【0117】

ウィリアムズ・イーエス(Williams ES), ヤング・エス(Young S), 「捕獲されたミュールジカの慢性消耗性疾患：海綿状脳症(Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy.)」, 1980年, J. Wildl. Dis. 16:8998

【0118】

ウォン・シー(Wong C), ジオン・エルダブリュー(Xiong LW), ホリウチ・エム(Horiuchi M), レイモンド・エル(Raymond L), ウエーリー・ケイ(Wehrly K), チェセブロ・ビー(Chesebro B), コーギー・ビー(Caughey B), 「硫酸化グリカンと昇温とにより、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質のPrP^{Sc}に依存する無細胞形成が促進される(Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP^{Sc}-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein)」, 2001年, EMBO J, 20(3):377-386

【0119】

ウッズ・エイ(Woods A), マッカーシー・ジェイビー(McCarthy JB), フルフト・エルテイー(Furcht LT), カウチマン・ジェイアール(Couchman JR), 「フィブロネクチンのCOOH末端ヘパリン結合領域からの合成ペプチドは、焦点癒着形成を促進する(A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation.)」, 1993年, Mol Biol Cell. Jun;4(6):605-13

【0120】

ヨシダ・アイ(Yoshida I), タシロ・ケイ(Tashiro K), モンジ・エイ(Monji A), ナガタ・アイ(Nagata I), ハヤシ・ワイ(Hayashi Y), ミツヤマ・ワイ(Mitsuyama Y), タシロ・エヌ(Tashiro N), 「ラミニン 1鎖カルボキシ末端球状領域のヘパリン結合サイトおよび生物学的活性の確認(Identification of a heparin binding site and the biological activities of the laminin alpha1 chain carboxy-terminal globular domain.)」, 1999年, J Cell Physiol. Apr;179(1):18-28.

【0121】

本発明の具体的な実施態様は以下の通りである。

10

20

30

40

50

【0122】

(1) (配列ID番号1) WQPPRARI; (配列ID番号2) NWCKRGRKQC KTH; (配列ID番号3) NYKKPKL; (配列ID番号5) YRGYRGYRGYRG; (配列ID番号6) YRGRYGYKGYGYRG; (配列ID番号7) AQKKDGGKRRKRSRKESYSIYV; (配列ID番号8) ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA; および (配列ID番号9) SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL R

からなる群から選ばれたペプチドを含むPrP^{Sc}を検出するための試薬。

(2) PrP^{Sc}の検出方法であって、

最初に、サンプルを実施態様1に記載のペプチドと接触させ、

ついで、PrP^{Sc}を検出する、

ことを含む検出方法。

(3) PrP^{Sc}を検出するための免疫学的検定法であって、

実施態様1に記載のペプチドを結合させた固体担体を供給し、

当該固体担体をサンプルと接触させ、

当該担体を洗浄して結合していないサンプルを除去し、

当該固体担体をプリオンに対し特異性を有する抗体に接触させ、

PrP^{Sc}が当該固体担体に結合しているかどうかを決定する検出ステップを実行することを含む免疫学的検定法。

(4) PrP^{Sc}の検出のためのキットであって、

実施態様1に記載のペプチドを結合させた固体担体と、

ラベル付けされた、プリオンに対し特異性を有する抗体と

を含んでなるキット。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】IP捕捉物とハムスターPRP^{Sc}の免疫プロットを示す。

【図2】IP捕捉物とBSE PRP^{Sc}の免疫プロットを示す。

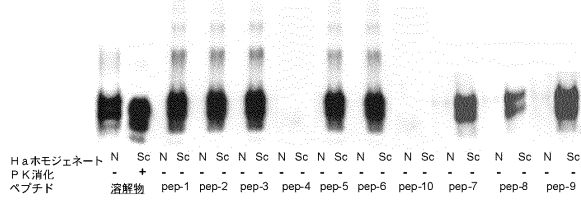
【図3】ペプチドによるvCJDの脳からのPRP^{Sc}の免疫捕捉を示す。

10

20

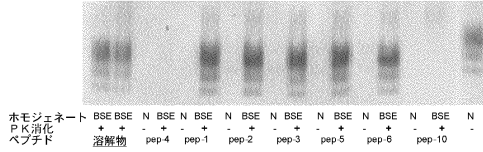
【 図 1 】

図1 ハムスターPrP^{Sc} のIP捕捉および免疫プロット
 正常(4 μL)およびスクレーパー(3 μL)のハムスター脳ホモジネートを、ゲルに直接ロードし、または、ビオチン化されたペプチドと接合したストレプトアビジン磁石ビーズを使用する免疫沈降に供した。3 F4を使用する免疫プロットによりPrPを検出した。スクレーパー溶解物はPKで消化し、直接ロードした。IP捕捉のためのホモジネートはPKで処理しなかった。



【 図 2 】

図2 BSE PrP^{Sc} のIP捕捉および免疫プロット
 正常なウシからの脳ホモジネート(10 μL)またはBSEのウシからの脳ホモジネート(5 μL)を、1 mLのIP緩衝溶液に加え、ペプチドビーズによる免疫沈降に供した。ついで、免疫沈降したPrPをPKで処理し、SDS-PAGEおよび、6H4で検出する免疫プロット法で分析した。BSE脳ホモジネートから捕捉されたPrPは、PK(50 μg/mL、37°Cで1時間)処理で抗PK疫のコアPrP^{Res}フラグメントを生じたので、真正のPrP^{Sc}と判明した。BSEと正常なコントロールからの脳ホモジネート清濁物も、PK(50 μg/mL、37°Cで1時間)の非存在下(-)または存在下(+)で培養し、コントロールとして、直接SDS-ゲルにロードした。



【 図 3 】

図3 vCJDの脳からのPrP^{Sc}のペプチドによる免疫捕捉
 ペプチド接合ビーズを使用して、レービー小体型菌糸(LBD)またはvCJDに感染したペイシエントからの清濁な脳ホモジネート(5 μL)中でPrPを免疫沈降した(99/090)。ついで、この免疫沈降物を、SDS-PAGE(4~12%ゲル)および、抗PrP抗体3F4を使用するウェスタンブロット法で分析した。5 μLの未処理LBDホモジネートおよび5 μLのPK処理したまたは処理しないvCJD脳ホモジネートをSDS-ゲルに直接ロードし、プリオン量を求めた。



【 配 列 表 】

0004837353000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン・ゼン

アメリカ合衆国、08869 ニュージャージー州、ラリタン、レンジ・ロード 7

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 国際公開第02/065133(WO, A1)

A Woods et al., A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation, *Molecular Biology of the Cell*, 1993年6月1日, Volume 4, Issue 6, pp. 605-613

Schmitt-Ulms G et al., Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein., *J Mol Biol.*, 2001年12月14日, 314(5), 1209-1225

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53 - 33/68

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于区分朊病毒的肽		
公开(公告)号	JP4837353B2	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	JP2005284933	申请日	2005-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断公司		
[标]发明人	ジャンゼン		
发明人	ジャン・ゼン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00		
CPC分类号	C07K7/08 C07K7/06 C07K14/4711 C07K14/50 C07K14/78 G01N33/54313 G01N33/6896 G01N2333/968 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA03 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA33		
优先权	60/614533 2004-09-30 US		
其他公开文献	JP2006105988A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种非侵入性方法来分离，浓缩和监测TSE疾病相关的致病性朊蛋白。 解决方案：从用几种特定肽感染朊病毒疾病的动物的脑匀浆中捕获PrP Sc。这八种肽不能从未患朊病毒疾病的个体中捕获细胞朊病毒蛋白。 【选择图】无