ノート

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

(平成 13 年 12 月 18 日受理)

武木田 薫^{*1} 菊池 裕^{*2} 山崎 壮^{*2,†} 掛谷知志^{*2}
 高鳥浩介^{*2} 棚元憲一^{*2} 澤田純一^{*2} 谷村顕雄^{*1}

Study on the Detection of Prion Protein in Food Products by a Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Kaori TAKEKIDA^{*1}, Yutaka KIKUCHI^{*2}, Takeshi YAMAZAKI^{*2,†}, Tomoshi KAKUYA^{*2}, Kosuke TAKATORI^{*2},
 Ken-ichi TANAMOTO^{*2}, Jun-ichi SAWADA^{*2} and Akio TANIMURA^{*1}

(^{*1}Showa Women's University: 1-7, Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154-8533, Japan;

^{*2}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku,
 Tokyo 158-8501, Japan; † Corresponding author)

We developed a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect prion protein contained in materials derived from cattle, aiming at establishing a method to detect abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in food products. Rabbit polyclonal antibodies were raised against bovine prion peptides. Using these antibodies, we have established a competitive ELISA that is capable of detecting recombinant bovine prion protein (rBoPrP) in the range of 12 to 1,200 ng and we used it to determine prion protein contents in bovine cerebral cortex. This assay system was evaluated by spiking food products with various amounts of rBoPrP. The determination gave 2-fold higher values in minced meat homogenates and lower values in large intestine homogenates than the values expected from the spiked amounts. This assay provides a simple determination method of spiked rBoPrP, and therefore is expected to be useful for investigating sample pretreatment methods.

(Received December 18, 2001)

Key words: 抗プリオンペプチド抗体 anti-prion peptide antibody; 組換えプリオンタンパク質 recombinant prion protein; 競合的 ELISA competitive enzyme-linked immunosorbent assay; ウシ大脳皮質粗抽出物 bovine cerebral cortex homogenate

緒言

ウシ海綿状脳症 (BSE) やヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に代表されるプリオン病は、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) が異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) に変化し、脳内に蓄積することによって発症すると言われている¹⁾。また、孤発性及び遺伝性 CJD が老年層で発症するのに対し、英国で BSE が初めて確認された約 10 年後の 1995 年以降、若年層で発症する変異型 CJD の症例が約 100 例報告されている。変異型 CJD の症例で確認された疫学的所見²⁾、BSE と変異型 CJD の病理学的所見³⁾ 並びにプリオン株のタイピングの生化学的所見⁴⁾ から、BSE に罹患したウシに由来する食品や食品原料の喫食が変異型 CJD の発症の原因と考えられている。

現在、日本及び EU の屠畜場では、サンドイッチ ELISA (Platelia[®] BSE test, フランス原子力委員会, 販売 Bio-Rad Laboratories) やイムノブロット法 (Prionics-Check[®] Western, Prionics AG, 販売 Roche Diagnostics Corp.) などのイムノアッセイで BSE の検査をしている^{5), 6)}。しかし、これらの検査キットは PrP^{Sc} が高濃度に蓄積する延髄などを検体とした動物用体外診断薬である。最近、食品や医薬品の原料にもなるコラーゲン及びゼラチンの PrP^{Sc} 汚染をイムノアッセイで検出する試み⁷⁾ やプリオンタンパク質 (PrP) 含量が低い非中枢神経系組織中の PrP^{Sc} をイムノアッセイで検出するための前処理法の検討⁸⁾ が報告されているが、いまだ食品や食品原料の PrP^{Sc} 汚染を検出する方法は確立されていない。

そこで著者らは、食品中の PrP^{Sc} 測定法の確立を目的とし、抗ウシ・プリオンペプチド抗体と組換えウシ・プリオンタンパク質 (rBoPrP) を用いた競合的 ELISA を構築し、ウシ由来食品試料への適用を試みた。

† 連絡先

^{*1} 昭和女子大学: 〒154-8533 東京都世田谷区太子堂 1-7^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

実験方法

1. 試薬及び器具

タンパク質濃度の測定には BCA Protein Assay Kit (Pierce 社製) を、プロテイン A カラムにはアフィゲルプロテイン A (Bio-Rad Laboratories 社製) を、銅キレートカラムには HiTrap Chelating HP column (Amersham Pharmacia Biotech 社製) に銅 (Cu^{2+}) を結合させたものを用いた。ELISA 用プレートには 96-well EIA plate (Costar 社製) を、第 2 抗体には β -galactosidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 及び β -galactosidase 標識ヒツジ抗マウス IgG (American Qualex 社製) を、酵素基質には 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside (4-MUG) (Sigma 社製) を用い、0.1 mmol/L 4-MUG、0.15 mol/L 2-mercaptoethanol を酵素基質溶液として用いた。その他は特級試薬を用いた。

2. 装置

蛍光強度の測定には Spectoran FL-2575 (東和科学(株)製) を用いた。

3. 試料及び調製方法

マグロ脳は千葉県銚子市の市場に入荷したキハダマグロ (*Thunnus albacares*) から採取した。ウシ大脳皮質は(財)畜産生物科学安全研究所の城戸靖雅博士から供与いただいたホルスタイン種系ウシ頭部(メス、成牛)から採取した。食用のウシ大腸(しまちゃん)及びウシ挽肉は国内産ウシの加工品を東京都内の小売店で購入した。

粗抽出物は、各試料を 0.32 mol/L ショ糖-50 mmol/L トリス-塩酸緩衝液 (Tris-HCl) (pH 7.2) (1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 添加) で均質化後に遠心 (1,000×g, 10 分, 4°C) して得た上清を用いた。また、ウシ大脳皮質粗抽出物を遠心 (10,000×g, 20 分, 4°C) して得た沈殿物を 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2) (1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF 添加) に溶解し、P2 画分として用いた。

4. 抗ウシ・プリオンペプチド抗体の調製

ウサギ抗血清の調製は既報⁹⁾に従って行った。ウシ・プリオンタンパク質のアミノ酸配列 104~123 残基の C 端にシステイン (Cys) を付したペプチド bPrP(104-123)-Cys 及び 225~241 残基のペプチド bPrP(225-241) にキャリアタンパク質としてヒト血清アルブミン (HSA) を *m*-maleimidobenzoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester で結合させた 2 種類の免疫原を調製し、ウサギ (ニュージーランドホワイト種、メス、16 週齢、1 群 3 匹) に免疫して bPrP(104-123)-Cys に対する抗血清 BPN1~BPN3 及び bPrP(225-241) に対する抗血清 BPC1~BPC3 を得た。免疫原の各ペプチドを固相抗原として用いた ELISA で抗血清の特異性を確認し、各群で最も高い抗体価を示した抗血清 (BPN1 及び BPC1) の抗体画分を精製した。ウシ・プリオンタンパク質のアミノ酸配列 146~159 残基の C 端に Cys を付したペプチド bPrP

(146-159)-Cys に卵白アルブミン (OVA) を結合させたものを免疫原として調製したマウス・ハイブリドーマ細胞 BSPX54¹⁰⁾ から、培養上清を調製した。この細胞は、帯広畜産大学の品川森一博士から供与いただいた。抗血清及びハイブリドーマ培養上清は硫酸分画した後、プロテイン A カラムで精製して抗体画分 (BSPX54: 1.8 mg IgG/mL, BPN1: 2.7 mg IgG/mL, BPC1: 8.4 mg IgG/mL) を調製した。

5. 組換えウシ・プリオンタンパク質の調製

ホルスタイン種系ウシ大脳由来 mRNA から RT-PCR 法によりプリオンタンパク質のコード領域の cDNA を調製し、その塩基配列¹¹⁾を確認した。PrP^C の 25~241 残基に相当する DNA 断片を発現ベクター pET23b (Novagen 社製) に挿入した発現プラスミドを *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS に導入し、組換えタンパク質を封入体として調製した。封入体を 8 mol/L 尿素で可溶化した後、ジスルフィド結合を形成させるために 4°C に 22 日間静置した。これを銅キレートカラムに吸着させ、100 mmol/L イミダゾールで溶出した画分を尿素濃度を順次下げながら透析して巻き戻し処理を行い、rBoPrP を得た。

6. 競合的 ELISA

ELISA は既法¹²⁾を一部改変して行った。固相抗原として rBoPrP を 10 mmol/L リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) (PBS) (0.02% アジ化ナトリウム (NaN_3) 添加) に溶解して 2 $\mu\text{g/mL}$ とし、ELISA 用プレートに 50 μL 分注後、4°C で 16 時間静置し、プレートに吸着させた。各ウェルを 0.02% Tween 20-PBS を用いて洗浄後、0.1% カゼイン-PBS (カゼイン-PBS) を 200 μL 加え、室温で 30 分間処理した。洗浄後、各ウェルに試料(阻害物質)としてカゼイン-PBS で希釈したウシ・プリオンペプチド又は rBoPrP を加えた後、第 1 抗体を添加し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、カゼイン-PBS で 10^{-3} に希釈した第 2 抗体 (β -galactosidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 又は β -galactosidase 標識ヒツジ抗マウス IgG) を 50 μL 加えて室温で 1 時間静置し、固相抗原に吸着した第 1 抗体に結合させた。未反応の第 2 抗体を洗浄し、酵素基質溶液を 100 μL 加えた。37°C で 1 時間反応させた後、1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液を 25 μL 加えて酵素反応を停止させ、遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光強度(励起波長: 360 nm, 蛍光波長: 450 nm)を測定した。固相抗原と第 1 抗体の結合に対して 50% の阻害活性を示す阻害物質の濃度を IC_{50} と定義し、阻害物質に対する抗体の反応性の比較を行った。

7. 組換えウシ・プリオンタンパク質の添加実験

ウシ大脳皮質、大腸及び挽肉の粗抽出物に rBoPrP を 3.72~37.2 ng/well (3~30 nmol/L) の範囲で添加して試料(最終総タンパク質濃度 2 mg/mL, 50 $\mu\text{g/well}$)とし、BPN1 抗体を用いた競合的 ELISA でプリオンタンパク質 (PrP) の測定を行った。あらかじめ、抗体と反応する

Table 1. IC₅₀ Values of Synthetic Peptides and Recombinant BoPrP in Competitive ELISA

Inhibitor	IC ₅₀ (nmol/L) ^a		
	BSPX54	BPN1	BPC1
bPrP(146-159)-Cys	8	ND ^b	ND
bPrP(104-123)-Cys	ND	800	ND
bPrP(225-241)	ND	ND	60
rBoPrP	>10,000	130	20,000

^a The concentration required to give a half of maximal inhibition.

^b Not determined.

Fig. 1. Standard curve for recombinant BoPrP

The ratio of the fluorescence intensity of the bound antibody in the presence of rBoPrP to that in the absence of rBoPrP (B/Bo) was plotted against the concentrations of rBoPrP added. Bars are means $\pm$ SE ($n=3$).

成分を含まないことを確認した魚脳粗抽出物（最終総タンパク質濃度 2 mg/mL）に rBoPrP を添加して作製した検量線から、試料中の PrP 量を算出した。

結果及び考察

1. 競合的 ELISA

rBoPrP を固相抗原とした ELISA を行い、免疫原の各種ペプチドと rBoPrP を用いた阻害実験（競合的 ELISA）の IC₅₀ を Table 1 に示した。マウス・モノクローナル抗体 BSPX54 に対して bPrP(146-159)-Cys は阻害活性を示したが、rBoPrP は実験に用いた濃度では阻害活性を示さなかった。BSPX54 はイムノブロット法で変性した PrP^C を認識するが¹⁰、本実験では ELISA の液相中の rBoPrP を認識しなかったと考えられる。一方、ウサギ・ポリクローナル抗体 BPN1 と BPC1 に対し、rBoPrP は bPrP(104-123)-Cys 又は bPrP(225-241) と同様に阻害活性を示した。BPN1 と BPC1 はウシ大脳皮質 P2 画分中の PrP^C の免疫沈降が可能な抗体であることを確認しており^{*3}、競合的 ELISA の結果からも液相中の抗原を認識することが確認された。rBoPrP の IC₅₀ が BPC1 より低い値を示した BPN1 を選択し、以降の実験を行った。

Table 2. PrP^C Levels in Bovine Cerebral Cortex Measured by Competitive ELISA

Fraction	ng/ μ g of total protein
Homogenate	0.31 $\pm$ 0.03
P2	1.00 $\pm$ 0.08

Homogenate: value is mean $\pm$ SE ($n=8$).

P2 Fraction: value is mean $\pm$ SE ($n=3$).

Fig. 2. Correlation between recombinant BoPrP and PrP determined by the competitive ELISA in bovine tissue-homogenates

A: cerebral cortex; B: large intestine; C: minced meat

The correlation coefficients (r) were calculated by fitting a straight line with the least square means.

Meyer らはサンドイッチ ELISA でサケ脳粗抽出物に rBoPrP を添加した試料を測定し、検量線を作製している^{13, 14}。本研究でもマグロ脳粗抽出物に rBoPrP を添加した試料を用いて検量線を作製し、ウシ由来試料中の PrP^C 量を測定した。Fig. 1 に 12~1,200 ng/well (10~1,000 nmol/L) の範囲で測定が可能な検量線を、Table 2 に大脳皮質粗抽出物及び P2 画分中の PrP^C 量を示した。P2 画分中の PrP^C 量は粗抽出物の約 3 倍であり、10,000 $\times g$ の遠心操作によって試料中の PrP^C が濃縮された。著者らはイムノブロット法で同一試料を定量したが¹⁵、その測定値は競合的 ELISA で得られた値とほぼ同じ値を示した。試料採取部位と動物種が異なるので正確な比較はできないが、本研究で測定したウシ大脳皮質中の PrP^C 量 (0.31 ng/ μ g 総タンパク質) は既報のウシ視床 (約 0.2 ng/ μ g 総タンパク質)¹³ 及びハムスター脳 (約 0.1 ng/ μ g 総タンパク質)¹⁶ とほぼ同等の値を示した。以上より、構築した競合的 ELISA の測定値は信頼性が高いと判断し、次にウシ由来食品に含まれる PrP の測定への適用を試みた。

2. ウシ由来試料への組換えウシ・プリオンタンパク質の添加実験

Fig. 2 に、rBoPrP の添加量 (3.72~37.2 ng/well) に対する PrP^C 測定値の回帰直線を示した。大脳皮質と大腸の粗抽出物に対する rBoPrP の添加実験では、回帰直線の傾

*3 私信

きは1より若干高い値を示した(大脳皮質: 1.20 ± 0.08 , 大腸: 1.29 ± 0.05). 標準添加法でX軸切片から求めた大脳皮質中のPrP^C量は $0.30 \text{ ng}/\mu\text{g}$ 総タンパク質で(Fig. 2A), Table 2に示した値($0.31 \pm 0.03 \text{ ng}/\mu\text{g}$ 総タンパク質)とはほぼ一致した. 大腸試料ではrBoPrPを無添加及び $3.72 \text{ ng}/\text{well}$ 添加した試料の測定値は検量線の定量有効範囲未満であった(Fig. 2B). 経口投与されたPrP^{Sc}は腸管の神経叢から生体内に取り込まれる可能性が指摘されている¹⁷⁾. また, 生体内にはラミニン受容体前駆体などのPrP結合タンパク質の存在が確認されており^{18), 19)}, 腸管に含まれる何らかのタンパク質にrBoPrPが特異的に結合し, 抗PrP抗体と結合可能なrBoPrP量を減少させてしまった可能性が考えられるが, 今後の検討が必要である. 一方, 挽肉に対する添加実験から得られた回帰直線の傾きは 2.18 ± 0.14 であった(Fig. 2C). 挽肉中に含まれる何らかの成分が, 抗体と固相抗原の結合を阻害し, 又は固相から抗原を遊離させ, 固相に結合した抗体量が減少して相対的に測定値(B/Bo)が高くなった可能性などが考えられる.

ハムスターPrP^{Sc}を標準品として用いた競合的ELISAによる各種抗体の特異性の検討も報告されているが²⁰⁾, いまだPrP^CとPrP^{Sc}を識別できるイムノアッセイ用抗体はなく, 試料をタンパク質分解酵素(Proteinase K, PK)で消化して残存したPrP^{Sc}を, 熱処理やグアニジン塩酸塩処理などで変性後, PrP^Cを認識する抗体でPrP^{Sc}を検出している^{21), 22)}. 同じアミノ酸配列のPrP^{Sc}でもその由来が異なるとPK抵抗性に差があることが知られており²³⁾, 過剰なPK処理ではPrP^CのみならずPrP^{Sc}も消化されて擬陰性を生じる²⁴⁾ため, 試料をPK処理せずに前処理する試みとしてMeyerらは熱処理と弱いグアニジンチオシアン酸塩処理を行ってPrP^{Sc}を定量する方法を提案している¹⁴⁾. しかし, タンパク質含量の高い試料の測定ではPK処理で消化されない様々なタンパク質による非特異的な測定系の妨害も予想され, 食品などのPrP含量が低い試料への適用には, 測定下限値を引き下げるための新たな前処理やPrPの濃縮が必要と思われる. 本研究で用いた食品試料中にもELISAを妨害する成分が存在し, その妨害様式も一様ではなかった. 食品や食品原料のPrP^{Sc}汚染を検出する方法の構築に当たり, 以上の問題点に対する検討が必要である. 競合的ELISAは, 標準物質としてrBoPrPを用いることにより感染性のPrP^{Sc}を使わずに妨害物質除去などの予備検討が可能であり, 他の動物種を対象としたELISAの構築にも利用できることから, 様々な家畜由来食品のPrP^{Sc}汚染の測定法を開発する際の前処理法やPrPの濃縮法の検討にも寄与するものと考えられる.

謝 辞

本研究の遂行に当たり, 抗ウシ・プリオンペプチド抗体産生ハイブリドーマBSPX54をご供与していただいた帯広畜産大学教授 品川森一博士, ウシ頭部をご供与してい

ただいた(財)畜産生物化学安全研究所理事 城戸靖雅博士, 並びに統計処理に関するご助言を頂いた国立医薬品食品衛生研究所主任研究官 村山三徳博士に深く謝意を称します.

本研究の一部は平成13年度厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業及び新興・再興感染症研究事業)により行った.

文 献

- 1) Prusiner, S. B., Molecular biology of prion diseases. *Science*, **252**, 1,515–1,522 (1991).
- 2) Yamanouchi, K., Progress of prion theory and bovine spongiform encephalopathy. *Tanpakushitu Kakusan Kouso*, **43**, 65–74 (1998).
- 3) Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C. J., Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498–501 (1997).
- 4) Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., Lantos, P., The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448–450 (1997).
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 “牛海綿状脳症に関する検査の実施について” 平成13年10月16日食発第307号. (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/0110/h1016-6.html>)
- 6) The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (Jul. 8, 1999), European Commission (http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12_en.html)
- 7) Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch. Virol.*, **144**, 177–184 (1999).
- 8) Grathwohl, K. U., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Improvement of PrP^{Sc}-detection in mouse spleen early at the preclinical stage of scrapie with collagenase-completed tissue homogenization and Sarkosyl-NaCl extraction of PrP^{Sc}. *Arch. Virol.*, **141**, 1,863–1,874 (1996).
- 9) Kikuchi, Y., Irie, M., Ikebuchi, H., Sawada, J., Terao, T., Identification of metallothionein in cultured cells by immunoblotting and immunofluorescence using a new monoclonal antibody. *Hybridoma*, **11**, 295–300 (1992).
- 10) Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., A cellular form of prion protein (PrP^C) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.*, **76**, 2,583–2,587 (1995).
- 11) Yoshimoto, J., Iinuma, T., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Analysis and expression of bovine PrP gene in mouse L-929 cells. *Virus Genes*, **6**, 343–356 (1992).
- 12) Sawada, J., Wada, N., Irie, M., Tokunaga-Doi, T., Oh-tsuka, E., Ikehara, M., Terao, T., Comparison of the antigenicities of native human growth hormone (hGH) and three forms of recombinant hGHs using monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, **23**, 625–630 (1986).
- 13) Meyer, R. K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbrig-

- gen, A., Vandevelde, M., A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrP^C) not observed with recombinant PrP. *J. Biol. Chem.*, **275**, 38,081–38,087 (2000).
- 14) Meyer, R. K., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP^{Sc} by treatment with heat and guanidine thiocyanate. *J. Virol.*, **73**, 9,386–9,392 (1999).
- 15) Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K., Tanimura, A., Sawada, J., Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.*, **48**, (2002) in press.
- 16) Pan, K. M., Stahl, N., Prusiner, S. B., Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.*, **1**, 1,343–1,352 (1992).
- 17) Will, R. G., Ironside, J. W., Oral infection by the bovine spongiform encephalopathy prion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4,738–4,739 (1999).
- 18) Martins, V. R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., de Souza, S. J., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., Zanata, S. M., Neto, V. M., Brentani, R. R., Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.*, **3**, 1,376–1,382 (1997).
- 19) Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I., Weiss, S., The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.*, **3**, 1,383–1,388 (1997).
- 20) Matsunaga, Y., Peretz, D., Williamson, A., Burton, D., Mehlhorn, I., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Baldwin, M. A., Cryptic epitopes in N-terminally truncated prion protein are exposed in the full-length molecule: dependence of conformation on pH. *Proteins*, **44**, 110–118 (2001).
- 21) Caughey, B., Horiuchi, M., Demaimay, R., Raymond, G. J., Assays of protease-resistant prion protein and its formation. *Methods Enzymol.*, **309**, 122–133 (1999).
- 22) Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., Grassi, J., Moynagh, J., Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, **409**, 476–478 (2001).
- 23) Chiesa, R., Harris, D. A., Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol. Dis.*, **8**, 743–763 (2001).
- 24) MacGregor, I., Prion protein and developments in its detection. *Transfus. Med.*, **11**, 3–14 (2001).