

図1. 各種サイトカイン欠損マウスの潜伏期

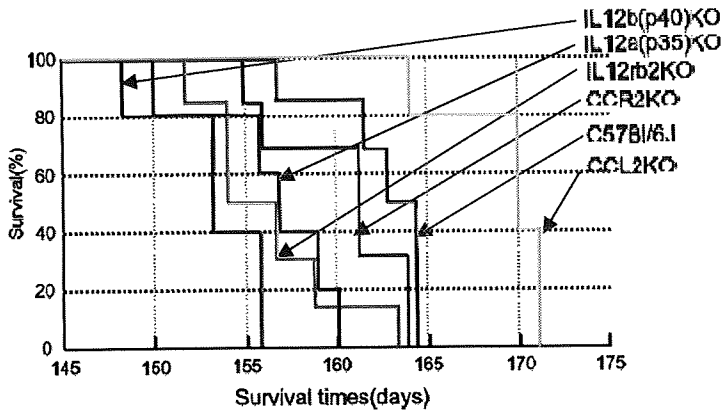
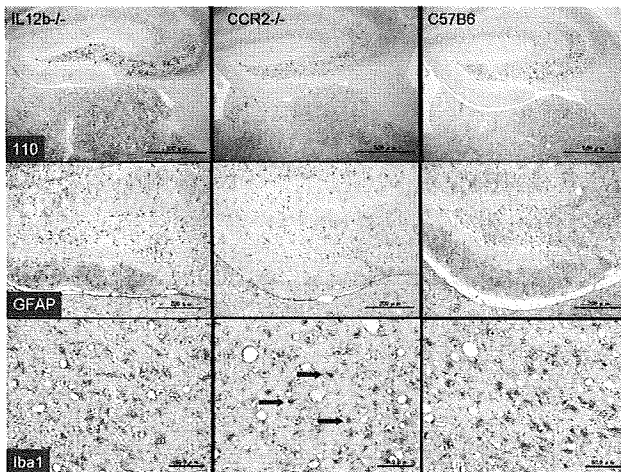


表 1. 各種サイトカイン欠損マウスのアストログリアおよびミクログリアの反応性

Genotype	Hippocampus		Cerebellum	
	Iba1	GFAP	Iba1	GFAP
IL-12b <sup>-/-</sup>	++	++	+	++
IL-12a <sup>-/-</sup>	+++	++	+	++
IL-12rb2 <sup>-/-</sup>	+	++	++	+
CCR2 <sup>-/-</sup>	-	+	-	++
C57BL/6	++	+++	++	++
CCL2 <sup>-/-</sup>	++	++	+	++

図 2. 小脳皮質強度病変部位の拡大像



IL-12b 欠損マウスおよび対照 C57B6 マウスでは海馬および視床におけるプリオンの蓄積部位 (110) に一致してアストログリア (GFAP) およびミクログリア (Iba1) の活性化がみられる。CCR2 欠損マウスではアストログリアの反応性は同様にみられるが、ミクログリアの活性化はほとんど観察されない。

図 3. 対照モルモット小脳皮質における VGLUT1、VGLUT2 および VGAT の局在

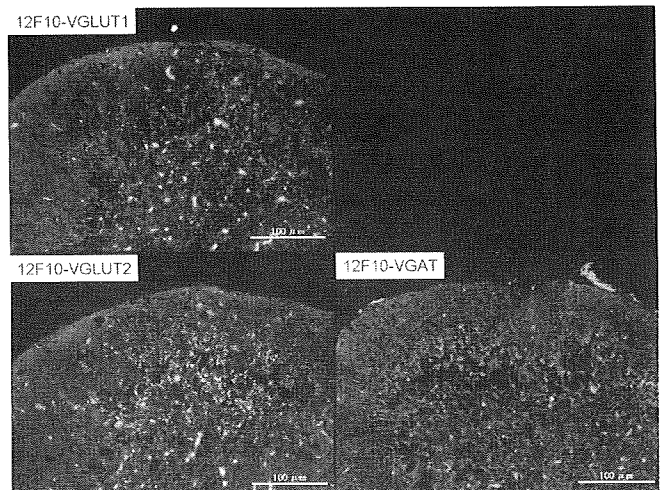


VGLUT1 陽性シナプスがプルキンエ細胞樹状突起を中心にびまん性に強い陽性反応を示し、VGLUT2 陽性シナプスおよび VGAT 陽性シナプスでは比較的太い樹状突起に沿って陽性がみられる。

表 2. 定型 BSE (JP10) および非定型 BSE(JP24) の伝達性

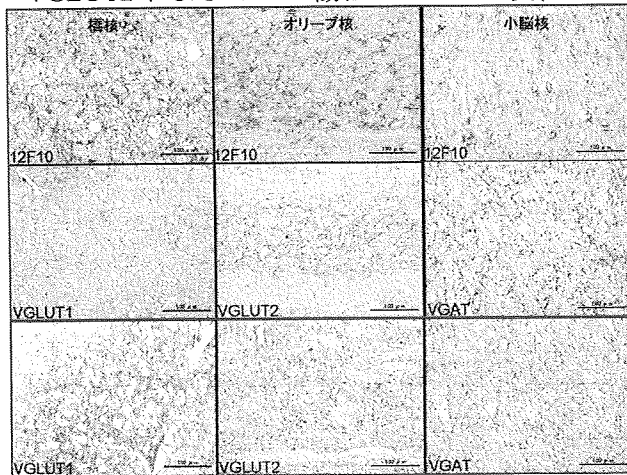
Inoculum	Animal species	No. diseased/ no. inoculated	Incubation period (days±SD)
BSE/JP10	ICR mice	5/5	475.6±99.6
	Common vole	1/5	344
	Guinea pig	4/5	492.5±229.4
BSE/JP24	ICR	0/5	>625
	Common vole	0/5	>198
	Guinea pig	0/5	>1175

図 4. 感染モルモット小脳皮質におけるプリオン、VGLUT1、VGLUT2 および VGAT の局在



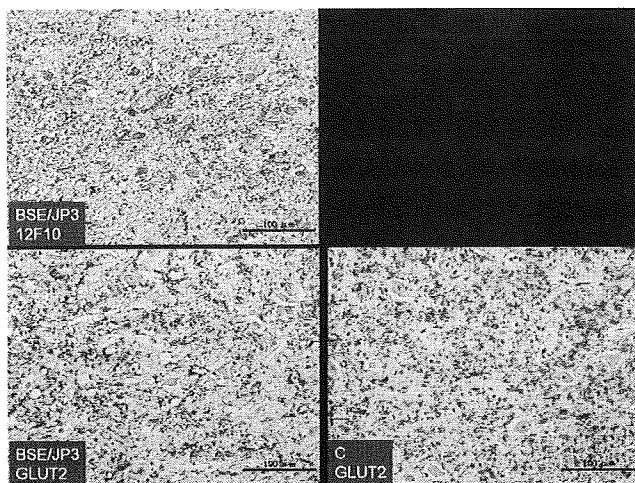
プリオン沈着部位における VGLUT2, VGAT の陽性シナプスは対照動物と同様であったが、VGLUT1 陽性シナプスの顕著な減少みられる。

図 5. 対照および感染モルモットにおける種々の神経核でのプリオンの蓄積と VGLUT1、VGLUT2 および VGAT 陽性シナプスの変化



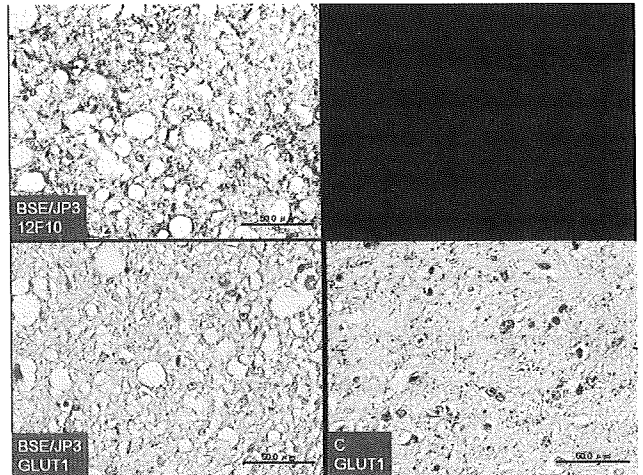
上二段は感染モルモット：プリオン蓄積部位に一致して橋核では VGLUT1 陽性シナプスの減少がみられる。オリーブ核、小脳核ではプリオンの蓄積が顕著であるが、VGLUT2 および VGAT 陽性シナプスは下一段の対照モルモットに比較して減少はほとんど観察されない。

図 7. BSE 牛オリーブ核における VGLUT2 陽性シナプスの変化



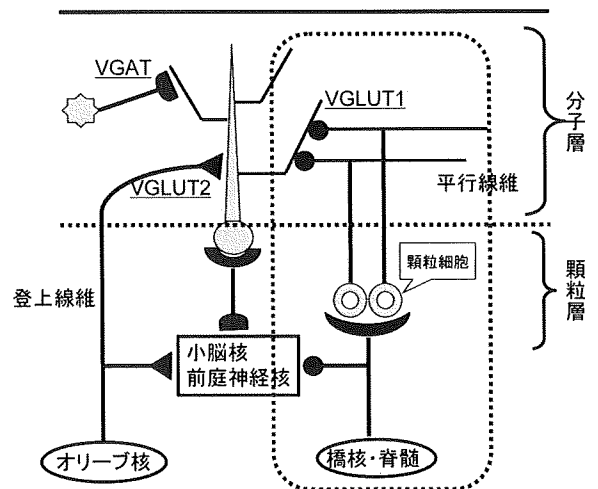
対照牛 (C) と比較して、BSE 牛 (JP3) ではプリオン陽性部位オリーブ核では VGLUT2 陽性シナプスの脱落は観察されない。

図 6. BSE 牛孤束核における VGLUT1 陽性シナプスの変化



対照牛 (C) と比較して、BSE 牛 (JP3) ではプリオン陽性部位孤束核での VGLUT1 陽性シナプスの顕著な脱落がみられた。

図 8. VGLUT1、VGLUT2、VGAT 陽性シナプスの神経解剖学的な分布とプリオン蓄積による選択的な脱落



感染モルモットおよび BSE 牛では点線で囲まれる VGLUT1 陽性シナプスの選択的な脱落がみられる。

### 3. 霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究

研究分担者 柴田宏昭 (医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

研究協力者 小野文子 ((社)予防衛生協会)

山河芳夫 (感染研・細胞病理部)

高橋秀宗、飛梅実、佐多徹太郎 (感染研・感染病理部)

寺尾恵治 (医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

**研究要旨** ヒトの変異型 CJD (vCJD) 発症リスク評価指標を確立する目的で、C-BSE (BSE JP/6 和歌山)、A-BSE (非定形 BSE JP/24 佐世保) の脳乳剤および BSE 感染発症カニクイザル (simian-BSE: S-BSE) の脳乳剤、血液を接種した幼若カニクイザルについて定期的に血液、尿、便、脳脊髄液の採取、リンパ節および脾臓生検を実施するとともに、運動機能試験、記憶能試験、脳波測定による神経機能解析を継続し、発症カニクイザルにおいて MRI 撮像と病理解剖を行った。経口投与、輸血継代ではいまだ明らかな症状は認められていないが、脳内接種カニクイザルでは全例において進行性の神経症状が認められた。安楽死直後の MRI 撮像により、いずれの発症カニクイザルにおいても顕著な脳室拡大等明らかな異常所見が認められた。C-BSE 牛脳乳剤を脳内接種した 3 頭のカニクイザルは接種後 2.3 年~3.7 年の潜伏期を経て発症が認められた。S-BSE 乳剤継代接種カニクイザルでは 1.1~1.5 年の潜伏期で発症が認められ、再現性の高い vCJD 早期発症系モデルが確立できた。A-BSE 脳内接種カニクイザルでは、1.6~1.8 年の潜伏期で発症が認められ臨床症状、病理組織学的所見においてヒトの孤発性 CJD に似た所見が認められた。

#### A. 研究目的

ヒトの BSE 発症リスクを評価するために、カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 感染モデルを作成し、ヒトにおける変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の病態解明および早期診断法を確立することを目的とする。併せて、BSE-P 接種後継時的に採取した血液、脳脊髄液、尿及び主要組織を研究班共通の研究資源として提供することも目的とする。

BSE 感染牛 (BSE/JP8 和歌山 : C-BSE) 脳乳剤の脳内接種、経口投与、発症カニクイザル (simian-BSE: S-BSE) 脳乳剤の脳内接種、輸血、および、非定形 BSE 感染牛 (BSE/JP24 佐世保 : A-BSE) 脳乳剤の脳内接種を行った 12 頭において発症までに定期的に調査した臨床症状、行動機能、記憶能、脳波および安楽死直後の MRI 所見についての臨床病態解析を行うとともにタンパクおよび組織病理学的解析に材料の提供を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試動物と接種法

1.4~2.4 歳の育成雄カニクイザル 12 頭を用いた (表 1)。使用動物は、P3 実験動物施設内の 2 頭

飼育型アイソレーターにおいて順化飼育後感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27°C、相対湿度 50-60%、12 時間証明 (7 時~19 時) に設定し、ステンレス製個別ケージの間を透明アクリル板で仕切り、相互の体動、声を感じることでできる環境とした。飼料は固形飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.) 70g とリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

接種材料は BSE/JP8 和歌山の 10%脳乳剤、非定形 BSE/JP24 佐世保の 10%脳乳剤を用いた。また、C-BSE 接種後発症したカニクイザル(#007)の 10%脳乳剤および血液を用いた。

経口投与は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、10%脳乳剤 2ml を 1 週間間隔で 3 回投与した。

脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後イソジンで消毒し、頭皮膚切開、側頭部頭蓋骨に直径 2mm の穿孔部を作成し、視床に脳乳剤 0.2ml を注入した。注入後、皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

輸血は発症カニクイザル(#007)血液を ACD 液で採取し塩酸ケタミン麻酔下で点滴により 40ml

を輸血した。レシピエントの輸血時体重はいずれも 1.7kg であった。

## 2. 行動観察

接種前より定期的に神経症状発現について行動観察を実施し、ビデオ撮影を行った。

## 3. MRI 撮像

発症したカニクイザルは塩酸ケタミンにより鎮静後、ヘパリンを静脈内注射し全身血液の凝固防止を行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により安楽死を行った。アクリル製密封型コンテナに動物を保定して MRI 撮像室への移動を行った。MRI 撮像は 3T MRI 装置 (MAGNETOM Allegra [Siemens 社]) を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高い S/N を持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルの CP 型コイルを用いて T1-3D、T2 およびプロトン強調画像、Flair 画像を撮像した。撮像条件および各条件の特性は表 2 のとおりである。

## 4. 材料採取

定期的に血液および脳脊髄液の採取を行った。動物は塩酸ケタミン麻酔下で血液は大腿静脈より採取した。脳脊髄液は背部剃毛後イソジンで消毒し、第 3～第 5 腰椎椎間より採取した。

体表リンパ節、腸管膜リンパ節および脾臓の生検を実施した。動物は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下で鼠経部および腹部の剃毛を行いイソジンで消毒し、皮膚切開後、鼠経リンパ節は、皮下組織を鈍性剥離後、基部血管を結紮し摘出した。腸管膜リンパ節および、脾臓生検の場合は腹部正中を切開し、リンパ節の基部を結紮後摘出した。脾臓の部分生検は摘出部分の脾動静脈結紮後脾臓を切除し、切断面の縫合を行った。採取後腹膜、皮下織および皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

(倫理面への配慮)

BSE-P 接種動物はすべて改良型の P3 アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚、聴覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするよう改良した。また、材料採取および脳波測定においては麻酔

下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応及び輸液療法等による維持管理をおこなった。

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、過剰量のペントバルビタールナトリウム静脈内投与により行った。

## C/D. 結果および考察

### 1. 発症個体の臨床経過

図 1 に発症経過を示した。C-BSE 経口投与を行った 3 頭は投与 6 年目まで顕著な神経症状は観察されていない。

C-BSE 脳内接種を行った 3 頭は、発症までの潜伏期間は 2 頭において 2 年 4 カ月、1 頭では 3 年 8 カ月、発症期間 7 カ月～1 年 3 カ月と個体差が認められたが、発症後の臨床症状には 3 頭ともほぼ同様な経過が観察された。すなわち、散発的な食欲不振、過敏行動 (外界や隣ケージサルからの刺激による驚愕反応)、振戦、四肢麻痺の散発、起立不能、全麻痺状態、横臥、安楽死の経過をたどった。

C-BSE 発症カニクイザル #007 (S-BSE) の血液を輸血した 2 頭は輸血後 3 年目までに顕著な神経症状は観察されていない。

S-BSE 脳乳剤を脳内接種した 2 頭では、いずれも接種後 1 年～1 年半で神経症状が認められ、4～6 カ月後に安楽死を行った。初期症状は軽度震戦や加速歩行、驚愕反応等が認められた。症状の進行に伴い運動失調、四肢麻痺、四肢の固縮、前傾姿勢が認められ、麻痺は進行し、起立困難となった。

A-BSE 脳乳剤を脳内接種した 2 頭では、接種後 1 年 7 カ月で神経症状が認められ約 4 カ月後に安楽死を行った。発症時期および発症期間は接種した 2 頭ではほぼ同様の経過をたどった。症状は加速歩行、立毛、前傾で膝が内反した姿勢をとり、後肢指先の持続的な不随意運動、四肢の顕著なミオクローヌス、企画震戦、運動失調が認められ、麻痺は進行し、起立困難となった。明らかな驚愕反応は認められなかった。

### 2. MRI 所見

C-BSE 脳内接種を行った #007 および #010 において、安楽死後の正常カニクイザル (図 2) の MRI 所見と比較したところ、視床枕において T2 強調像および FLAIR 画像で高信号領域が観察され、小脳皮質において境界明瞭な高信号領域が見られた。全身麻痺症状を示し 10 日間生存した #7 では脳室の拡大が認められた (画像は H19 年度報告書)。

S-BSE 脳内接種カニクイザルにおいて明らかな

脳室拡大が認められた(図3, 4)。特に#017では側脳室の顕著な拡大と大脳皮質の萎縮が認められた。いずれの動物でも T2 画像で小脳領域が全体に高信号であった。

A-BSE 脳内接種カニクイザル(図5, 6)では潜伏期間1年半、発症期間5カ月と短期であるにもかかわらず、激しい脳室拡大と大脳皮質の萎縮所見が認められた。小脳の高信号は C-BSE、S-BSE 接種カニクイザルに比べて低かった。Flair 撮像において、脳梁膨大部の顕著な高信号が認められた。

#### E. 結論

C-BSE 感染ウシ脳乳剤脳内接種カニクイザルは潜伏期2年4カ月~3年9カ月、発症期間8カ月~1年3カ月と個体差があった。

カニクイザル継代株である S-BSE 接種により、潜伏期間は半減し、臨床症状、病理組織学的所見にも花弁状のプラークが認められ、vCJD に近い所見が得られた。再現性の高い早期発症系モデルと考えられる。

A-BSE 感染ウシ脳乳剤脳内接種において、振戦、ミオクローヌス、麻痺等の臨床症状を伴う早期発症、顕著な脳萎縮が認められ、病理組織学的所見において微細顆粒、シナプティックな分散が認められ、孤発性 CJD との相同性について今後解析を進めていく。

安楽死直後の MRI 撮像により、顕著な脳萎縮と異常所見が認められたことから、今後生体を用いた経時的撮像により、早期診断系の確立に有用であると考えられた。

両株を用いたサル CJD 感染モデル系により、vCJD および sCJD 病態解明への有用性が示唆された。今後、早期診断系確立および治療研究に非常に有用なモデル系であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録

表1 BSE接種群

接種材料	接種日	接種ルート	通番	国籍	遺伝子型	接種年齢
BSE(BSE JP/8 和歌山)脳乳剤	2003/4/14	P.O	#001	混血		1.7
	2003/4/14	P.O	#002	混血		1.7
	2003/4/14	I.P	#003	マレーシア		1.6
	2003/4/14	I.P	#004	混血		2.0
BSE(BSE JP/8 和歌山)脳乳剤	2003/8/6	P.O	#005	マレーシア	M/M, E/E	2.3
	2003/8/6	P.O	#006	インドネシア	M/M, E/E	2.2
	2003/8/6	I.C	#007	フィリピン	M/M, E/E	2.0
	2003/9/13	P.O	#009	インドネシア	M/M, E/E	2.4
	2003/9/13	I.C	#010	フィリピン	M/M, E/E	2.3
	2003/9/13	I.C	#011	マレーシア	M/M, E/E	2.4
発症サル(#7)血液	2006/9/12	I.V	#012	インドネシア	M/M, E/E	1.4
	2006/9/12	I.V	#013	混血	M/M, E/E	1.7
発症サル(#7)脳乳剤	2007/9/12	I.C	#016	マレーシア	M/M, E/E	2.1
	2007/9/12	I.C	#017	混血	M/M, E/E	2.0
非定形BSE(BSE JP/24 佐世保)脳乳剤	2007/9/12	I.C	#014	混血	M/M, E/E	2.1
	2007/9/12	I.C	#015	混血	M/M, E/E	2.0

表2 MRI撮像条件

Parameter		T1 強調画像(3D)	T2協調画像	Flair画像
Slice distance	%	50	100	100
FOV	mm	150	180	180
Slice thickness	mm	1	2	2
TR	msec	2500	4000	9000
TE	msec	3.89	101	18
脂肪		高信号	高信号	高信号
水(脳脊髄液、血液等)		低信号	高信号	低信号
出血(慢性期)		高信号	高信号	高信号
腫瘍病変(脳等と比較)		等ないし低信号	軽度高信号	軽度高信号
特性		解剖学的構造が捉えやすい	多くの病変が白く写るので、病変の拾い出しに有効	自由水信号を抑制する撮像方法で、水を黒くしたT2強調画像。脳溝や脳室に接する病変の診断に特に有効

図1 BSE発症経過

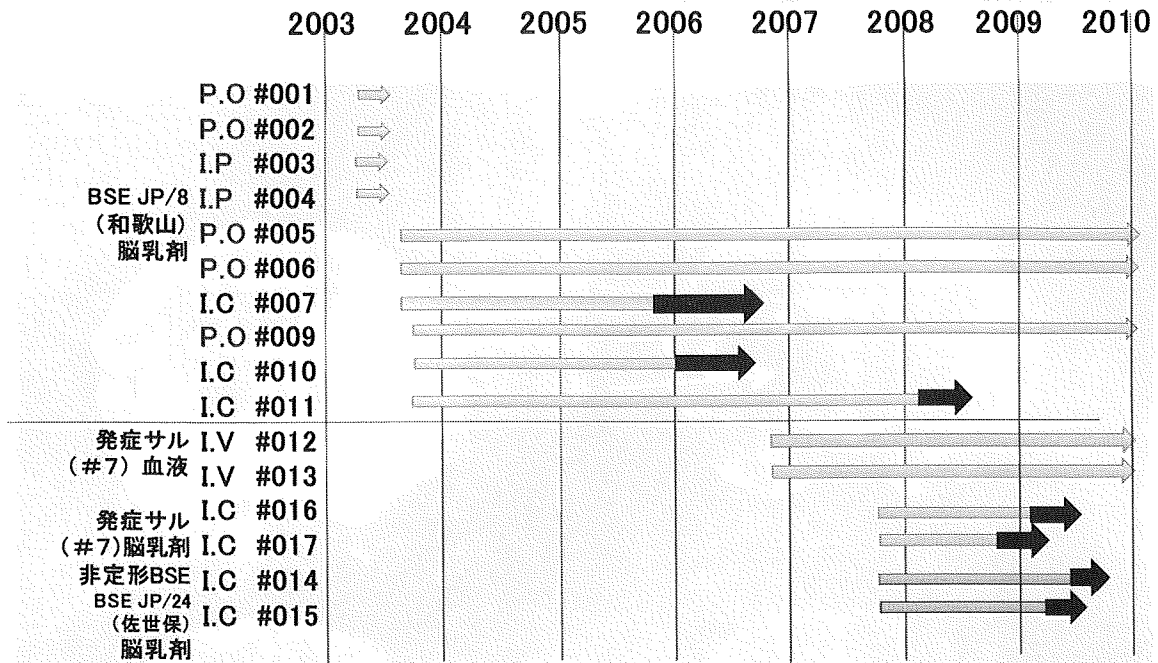


表3 BSE発症経過

接種群	接種材料	接種日	接種ルート	通番	個体番号	接種年齢	潜伏期間	発症期間	解剖年齢
第1群	BSE(BSE JP/8 和歌山)脳乳剤	2003/8/6	脳内	#007	1220107047	2.0	2.3	0.8	5.1
		2003/9/13	脳内	#010	1220105035	2.3	2.3	0.6	5.2
		2003/9/13	脳内	#011	1220105029	2.4	3.7	1.2	7.3
		2003/8/6	経口	#005	1220105028	2.3			
		2003/8/6	経口	#006	1220105031	2.2			
		2003/9/13	経口	#009	1320104042	2.4			
第3群	発症サル(#7) 血液	2006/9/12	静脈内	#012	1320504051	1.4			
		2006/9/12	静脈内	#013	1220501003	1.7			
	発症サル(#7) 脳乳剤	2007/9/12	脳内	#016	1420508020	2.1	1.5	0.4	3.9
		2007/9/12	脳内	#017	1420509024	2.0	1.1	0.5	3.6
第4群	非定形BSE(BSE JP/24 佐世保) 脳乳剤	2007/9/12	脳内	#014	1320508089	2.1	1.7	0.4	4.2
		2007/9/12	脳内	#015	1320509102	2.0	1.6	0.4	3.9

図2 正常カニクイザル 脳 MRI画像

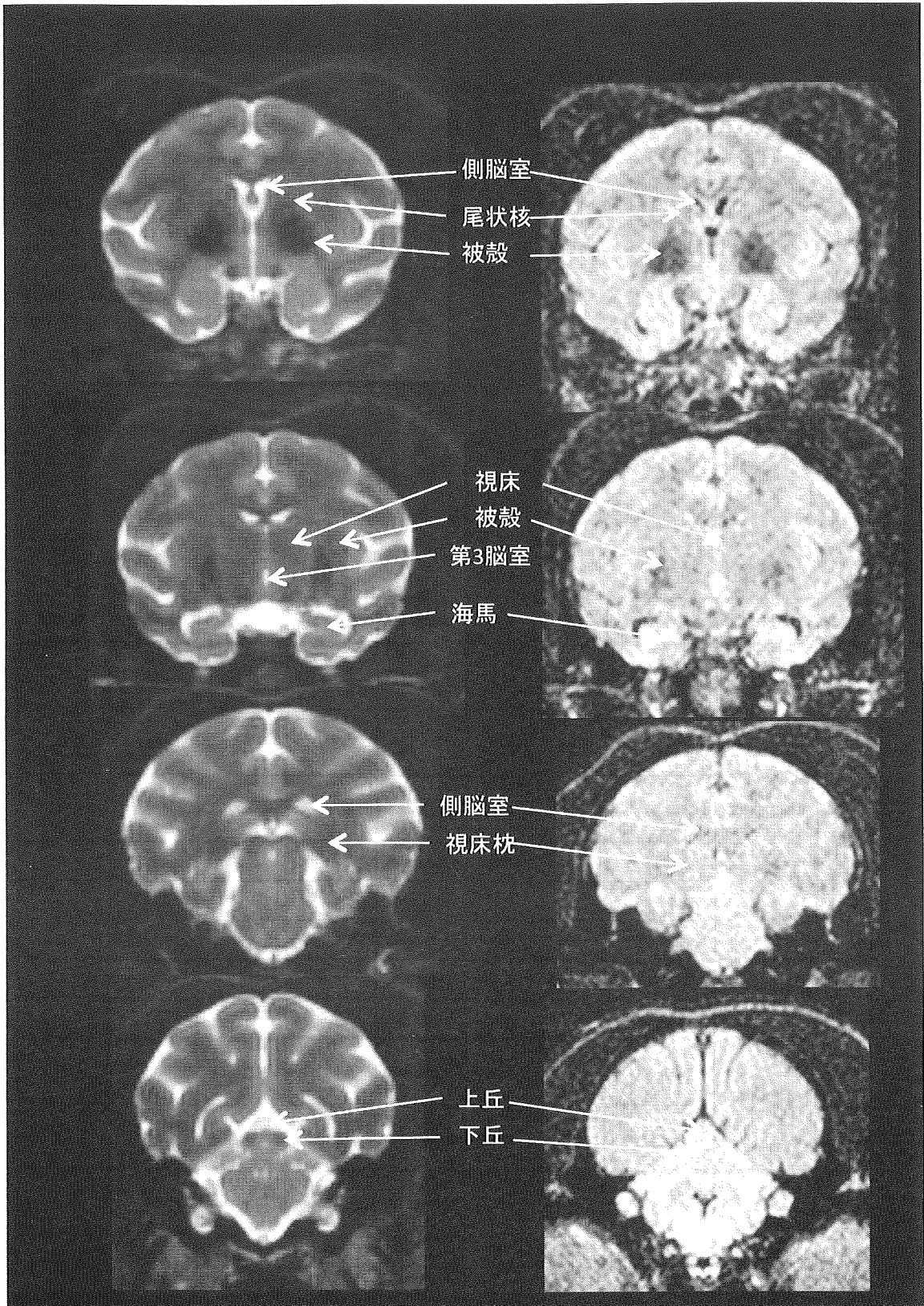
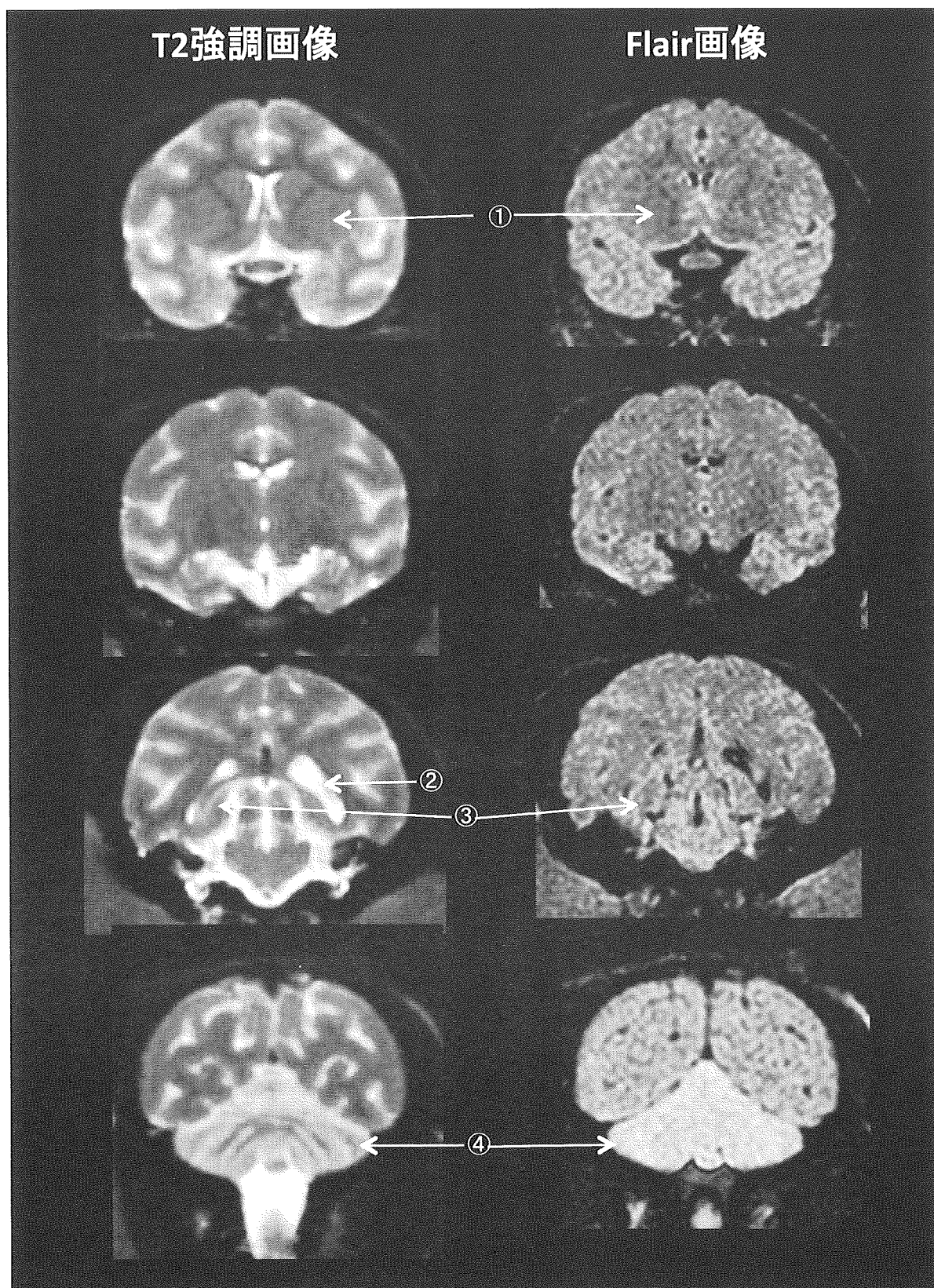


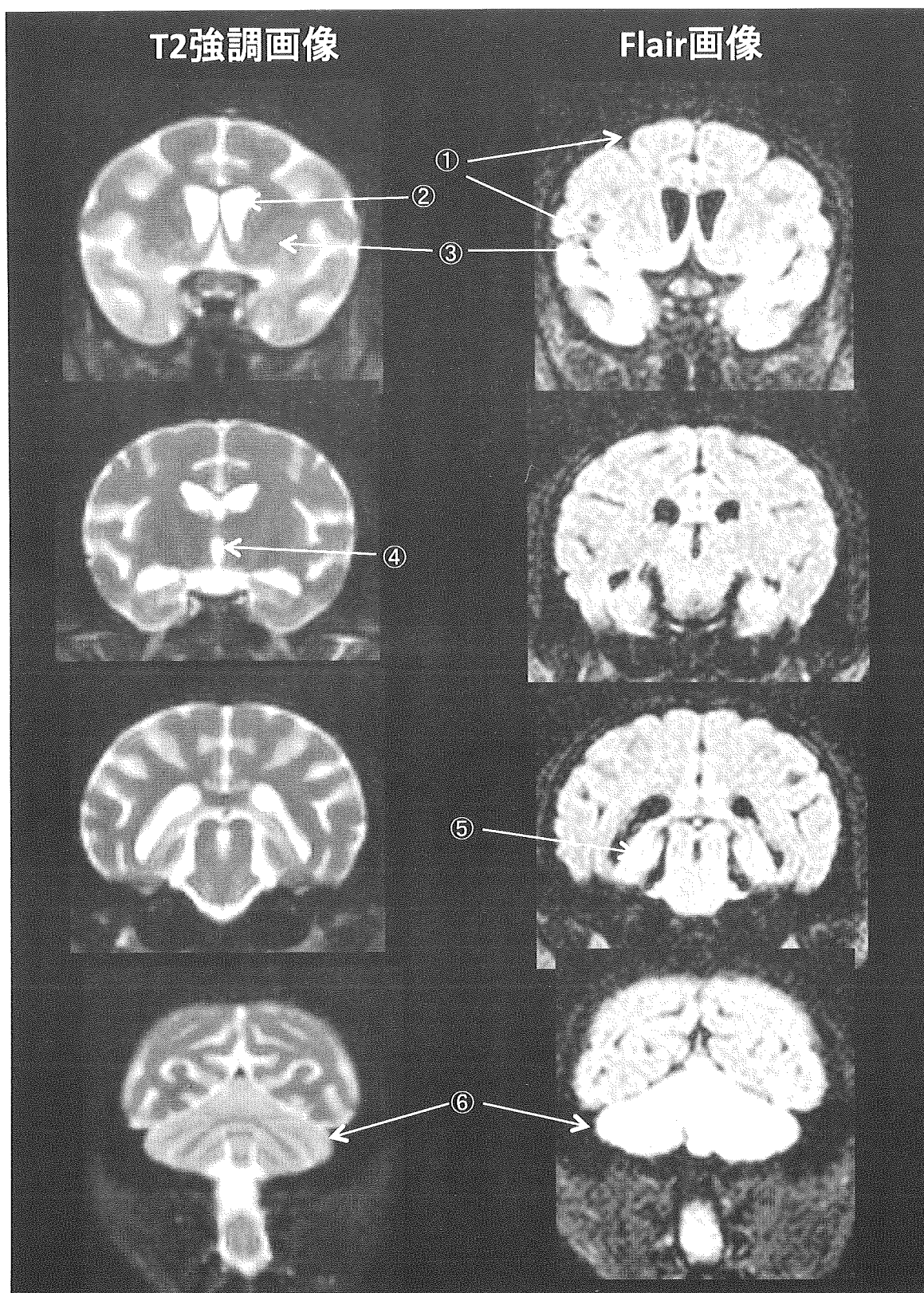


図3 #016 発症カニクイザル(#007)脳乳剤脳内接種カニクイザル MRI画像



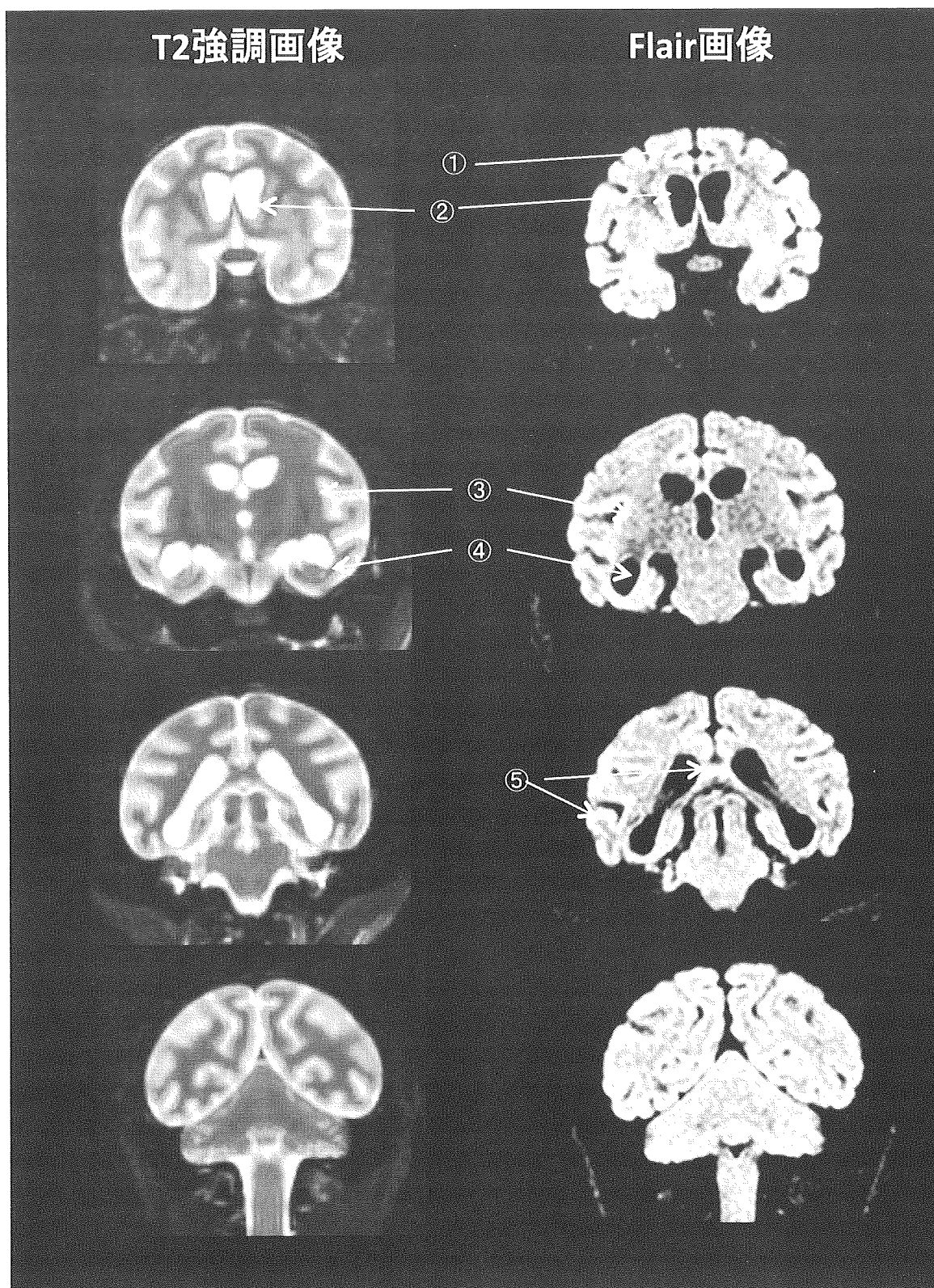
- ①本来低信号の被殻がやや高信号 ②側脳室拡張  
③視床枕がわずかに高信号 ④小脳全体的に高信号

図4 #017 発症カニクイザル(#007)脳乳剤脳内接種カニクイザル MRI画像



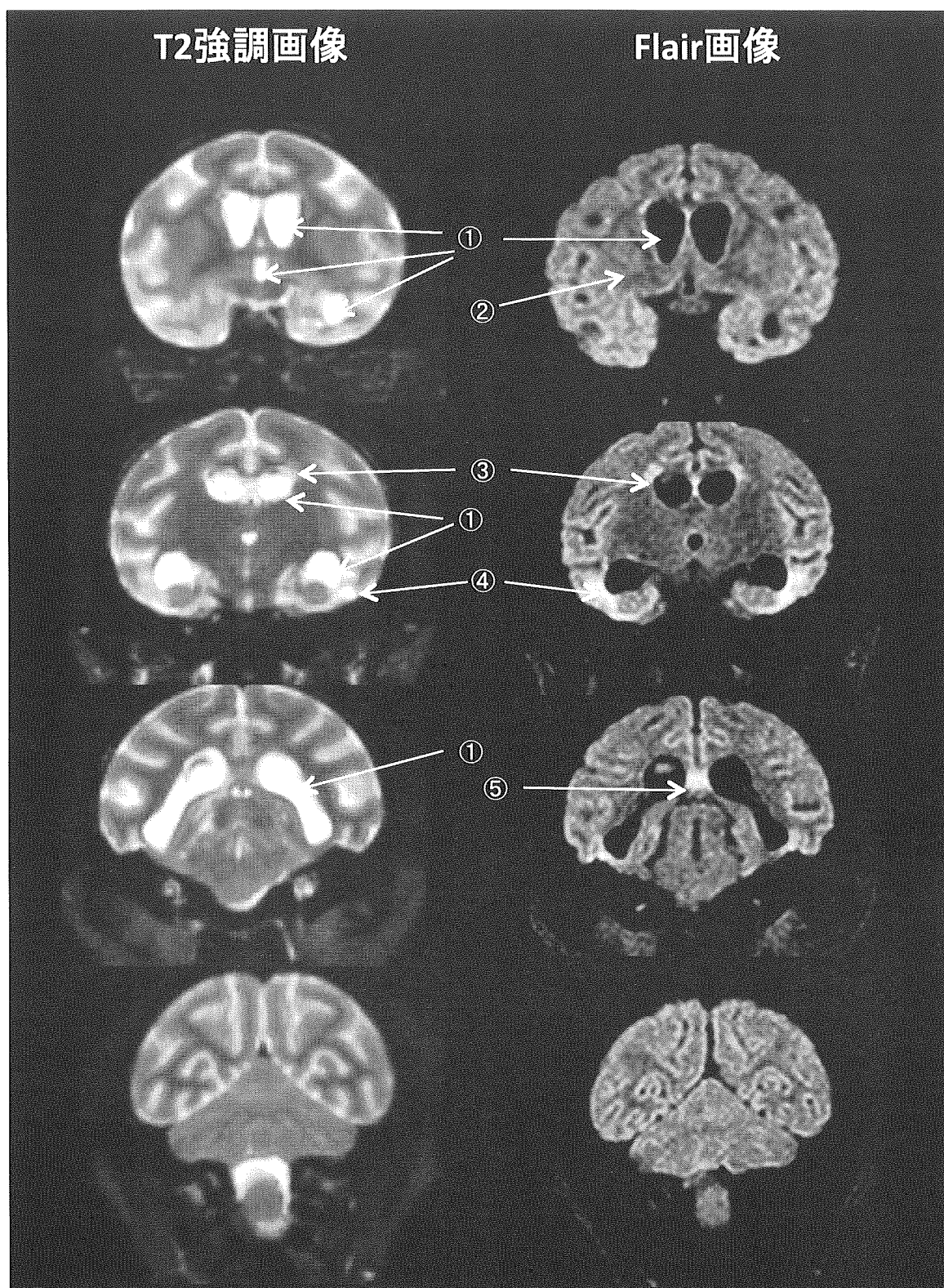
- ①大脳外側溝深く、脳萎縮顕著 ②側脳室著しい拡張 ③大脳基底核やや高信号  
④第3脳室拡張 ⑤視床枕高信号 ⑥小脳高信号

図5 #014 非定形BSE(BSE JP/24 佐世保)牛脳乳剤脳内接種カニクイザル MRI画像



- ① 带状溝等辺縁高信号、萎縮顕著 ② 側脳室顕著な拡張  
③ 大脳外側溝高信号 ④ 海馬萎縮 ⑤ 脳梁、中側頭回高信号

図6 #015 非定形BSE(BSE JP/24 佐世保)牛脳乳剤脳内接種カニクイザル MRI画像



- ①側脳室、第3脳室著しく拡張 ②大脳基底核全体に低信号域散在  
③尾状核痕跡高信号 ④海馬萎縮、高信号 ⑤脳梁高信号

## 4. BSE/JP24 (Sasebo) 病原体の近交系マウスへの伝播、 ならびに生化学・病理学的解析と株化

研究分担者 萩原 健一 国立感染症研究所 細胞化学部

研究協力者 山河芳夫、原 英之 (国立感染症研究所・細胞化学部)  
佐多徹太郎、佐藤由子 (国立感染症研究所・感染病理部)

研究要旨 非定型 BSE (BSE/JP24) の病原体の性状解析・株化を目的として、近交系マウス (C57BL/6J、SJL、RIII) への伝播実験を 2006 年に着手した。2 年間以上の長期観察による初代伝播実験では、3 系統の全てのマウスにおいて PrP<sup>Sc</sup> の明らかな蓄積は検出できず、脳組織の変性も認められなかった (飼育最長日数: C57BL/6J=844 日、SJL=528 日、RIII=850 日。SJL は 300 日齢以上で腸管肉腫の自然発生が多発する系統である)。そこで、これらのマウスの脳ホモジネートを 2008 年 9 月 (C57BL/6、SJL、RIII)、2009 年 2 月 (C57BL/6) に上記 3 系統のマウスへ 2 代目接種し、本年度は 2 代目マウスについての観察を行った。このうち C57BL/6 および RIII マウスは観察継続中であり、現在まで発症の兆候は認められない。SJL マウスは細網肉腫を形成しやすく短命であるため、接種した 20 匹中これまでに 18 匹を採材して PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を検索したが、脳、脾臓、回腸遠位部のウエスタンブロット分析および免疫組織化学分析は PrP<sup>Sc</sup> 陰性であり、病理組織観察での脳の空胞変性も認められなかった。一方、上記の非定型 BSE の伝播実験と並行して、classical BSE 罹患ウシ 2 例 (BSE/JP6 ; 1996 年生と BSE/JP12 ; 1999 年生) について誕生年の相違により BSE プリオンの性状が異なる可能性を検証するために、近交系マウスへの 2 次伝播実験 (2008 年 9 月から)、次いで 3 次伝播実験 (2009 年 2 月から) を進めた。その結果、C57BL/6J マウスを感染宿主として 3 次伝播を経た BSE プリオンは、潜伏期、免疫組織化学分析による PrP<sup>Sc</sup> の蓄積部位、病理組織所見、のいずれにも BSE/JP6 と BSE/JP12 との間で差は認められなかった。

### A. 研究目的・背景

BSE/JP24 (Sasebo) 例は、蓄積した異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の糖鎖型がウエスタンブロット分析においてヒト・孤発性 CJD type 2 の PrP<sup>Sc</sup> に類似し、また、脳組織の一部に PrP<sup>Sc</sup> のアミロイドプラークを形成するという、classical BSE 罹患ウシとは異なった特徴をもつ (Hagiwara K, *et al*, *Jpn J Inf Dis* 60: 305, 2007)。

そこで本研究では、1) 非定型例である BSE/JP24 のプリオン病原体は、果たして近交系マウスへ伝播可能かという点、および 2) 非定型 BSE が近交系マウスへ伝播可能ならば、マウスへ伝播後の異常型プリオン蛋白質は、「非定型」の特徴を維持するのか、それとも classical BSE の特徴へ収束するのであろうか、という 2 点について検証を行ない、この非定型例のプリオン病原体についての知見を深めることを目的とした。また、近交系マウスに対して伝播し得るならば、継代に

より病原体の株化を進める。

### B. 研究方法

接種に用いた BSE 罹患ウシ 3 例 (BSE/JP24、BSE/JP6、BSE/JP12) の脳乳剤の調製法は昨年報告書に記載した。また、2 代目および 3 代目の伝播実験では、接種材となるマウス脳の 1% ホモジネートを生理食塩水 (大塚製薬) を用いて調製し、この 25  $\mu$ L を 2 段針 (星盛堂医療器工業) により 6-8 週齢マウスの頭蓋矢状縫合およびその近傍から脳内に接種した。(2 代目接種匹数 <JP24>; BL to BL6=20、SJL to SJL=20、RIII to RIII=4 <JP6>; BL to BL6=7、SJL to SJL=10、SJL to BL6=6、RIII to RIII=4 <JP12>; BL to BL6=7、SJL to SJL=21、SJL to BL6=14、RIII to RIII=4。3 代目接種匹数 <JP6>; BL to BL6=7 <JP12>; BL to BL6=7)。

プリオン病症状を呈したマウスは人道的エン

ドポイントを踏まえて安楽殺に処し、脳・脾臓・回腸遠位部を採材した。また、プリオン病様の症状とは断定できないが何らかの病的症状を呈したマウスは安楽殺に処し、同様に採材した。採材組織は-80℃にて保管あるいはホルマリン固定を施し、常法によりウエスタンブロット分析(44B1抗体を主として使用)および病理・免疫組織化学分析(T4抗体を主として使用)を行った。ウエスタンブロット分析は、BSE罹患ウシの脳組織およびObihiro 1株の接種により発症したマウスの脳組織のホモジネートをPK消化したものの規定量を陽性コントロールとして用い、コントロールのシグナル強度で標準化することにより各採材試料中に検出されたPrP<sup>Sc</sup>量を定量的に比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得て実施した。また、感染材料の取り扱いには国立感染症研究所の病原体等安全管理規定を遵守した。

### C. 研究結果

1) BSE/JP6 および BSE/JP12 の初代伝播実験の結果は昨年度に報告した。一方、BSE/JP24 脳ホモジネートを初代接種した3系統のマウスの観察は、観察期間がマウスの自然寿命にほぼ至ったために本年度に観察を終了した(飼育最長日数: C57BL/6J=844日、SJL=528日、RIII=850日)。これらのBSE/JP24 脳ホモジネートを接種したマウスは1匹の擬陽性例[次項3)-(i)参照]を除き、脳、脾臓、回腸遠位部のウエスタンブロット法ならびに免疫組織化学染色法によるPrP<sup>Sc</sup>の検索および病理組織観察による脳の空胞変性所見ともに陰性であった。

2) 上記1)のとおり、非定型BSE/JP24の初代伝播ではPrP<sup>Sc</sup>の蓄積、病理組織像とも陰性であったが、PrP<sup>Sc</sup>陰性の脳ホモジネートを用いて2代目伝播(脳内へ投与)を開始した。細網肉腫形成のために短命であるSJLマウスについては、実験群の全10匹中これまでに8匹を採材してPrP<sup>Sc</sup>の蓄積を検索したが、脳、脾臓、回腸遠位部のウエスタンブロット分析および免疫組織化学分析はPrP<sup>Sc</sup>陰性、病理組織観察での脳の空胞変性も認められなかった。C57BL/6J および RIII マウス

は、現在、経過を引き続き観察中であるが、外見적인発症兆候は認められていない(接種後日数: C57BL/6J=365日、RIII=525日)。

3) (i)BSE/JP24 を初代接種した SJL マウス 1 匹の脳のウエスタンブロット分析において、抗 PrP 抗体により検出される弱いシグナルが検出されたこと、また、(ii)BSE/JP12 を初代接種した SJL マウス 1 匹の脾臓のウエスタンブロット分析において非定型 BSE に類似の糖鎖型を示す PrP<sup>Sc</sup> が認められたこと、を昨年度に報告した。これらについて 2008 年に同系統マウスを用いた 2 次伝播実験を開始し、2009 年にかけて経過観察を行った。その結果、(i)の脳ホモジネートを接種した SJL マウス(全 10 匹)では、発症症状は認められず、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積・病理組織像も陰性だった。また、(ii)の脾臓ホモジネートを接種した SJL マウス(全 10 匹)は発症した。この発症マウスの脳、脾臓、回腸遠位部に蓄積した PrP<sup>Sc</sup> の糖鎖型は classical BSE の糖鎖型となっていた。

4) BSE/JP6 と BSE/JP12 について、C57BL/6、SJL および RIII マウスへの 2 代目伝播を完遂させた。さらに、C57BL/6 マウスに伝播させたプリオンについては同マウスへの 3 代目伝播を行った。BSE/JP6 と BSE/JP12 は異なる誕生年コホートに属するが、C57BL/6 マウスで 3 代継代した後の両者由来のプリオンは、その潜伏期、免疫組織分析での PrP<sup>Sc</sup> の蓄積部位、病理像所見のいずれにも相違は認められなかった(図 1)。

### D. 考察

先にイタリアで摘発された非定型 BSE (BASE; Casalone C, et al, Proc Natl Acad Sci USA 101: 3065, 2004) の病原体は、その糖鎖型(無糖鎖: 1 糖鎖: 2 糖鎖が占める比率)が BSE/JP24 プリオンと極めて類似している。本研究の実施中に、BASE を C57BL/6 および SJL マウスへ接種すると、初代では PrP<sup>Sc</sup> 蓄積が検出されないが、2 代目継代を行うと定型 BSE と区別不能な糖鎖型および病理学的特徴を生じたという報告がなされた(Capobianco R, et al, PlosPathog 3: e31, 2007)。この報告と異なり、BSE/JP24 では初代・2 代目伝播ともに PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は検出されていない(2 代目伝播は観察継続中)。両者の違いの原因として、BSE/JP24 プリオンと BASE プリオンとは非常に

類似した生化学的性状を有しながらも病原性には差があるためか、あるいは BASE 罹患ウシ (= 野外摘発例) は非定型プリオンと classical BSE プリオンに 2 重に感染していたためか、という可能性が考えられる。

S.E. Lloyd らは、或る 1 頭の BSE 罹患ウシの脳ホモジネートを C57BL/6 マウスに接種すると定型 BSE の糖鎖型を呈するが、SJL マウスに接種したところ、ヒト孤発性 CJD に類似した糖鎖型を呈し、また、これを SJL マウスに 2 代目接種するとヒト孤発性 CJD 類似の糖鎖型は維持されたと報告している (J.Gen.Virol. (2004), 85, 2471)。本研究では、BSE/JP12 を初代接種した SJL マウス 1 匹の脾臓のウェスタンブロット分析において非定型 BSE に似た糖鎖型 (= ヒト孤発性 CJD type 2 に類似する) を示す PrP<sup>Sc</sup> が検出されたことを昨年度に報告した。Lloyd らの報告を鑑み、この SJL マウスの脾臓ホモジネートをさらに SJL マウスへ 2 代目接種した。その結果、接種マウスは発症したが、脳、脾臓、回腸遠位部に検出された PrP<sup>Sc</sup> は classical BSE の糖鎖型を呈した。この実験結果の解釈は難しい。

#### E. 結論

近交系マウス 3 系統への初代伝播実験において、BSE/JP24 病原体は PrP<sup>Sc</sup> の蓄積や神経組織の変性を引き起こさなかった。経過観察中の 2 代目接種マウス群においても、これまでに PrP<sup>Sc</sup> の蓄積や発症症状は認められない。本研究の当初の計画 (この時点で、下記 E 欄の BASE プリオンの伝播実験結果は未公表であった) では、「BSE/JP24 病原体は近交系マウスへ伝播可能」と想定し、近交系マウスへの伝播実験により病原体の株化を行うことを考えていた。本研究が進んだことにより、BSE/JP24 病原体が classical BSE 病原体とは異なる性状であることが明らかになった。同時に、当初の想定に反して、BSE/JP24 病原体は近交系マウスへおそらく伝播せず、よって近交系マウスを宿主とする実験系では BSE/JP24 病原体の株化は不可能であろうということも明らかになりつつある。

Classical BSE である BSE/JP6 と BSE/JP12 については、誕生年コホートによる BSE 株の相違の有無が議論されていた。C57BL/6 マウスでの 3 代伝

播によりプリオンは同マウスに馴化し、ほぼ株化できたと考えられる。3 代目継代後において、誕生コホート間で潜伏期、免疫組織化学分析による PrP<sup>Sc</sup> の蓄積部位、病理組織所見、の差は認められず、BSE/JP6 と BSE/JP12 のプリオンの間に本質的な差は無いと考えられる。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 萩原健一、山河芳夫、花田賢太郎：ヒト・プリオン病-感染症としての変遷と新たな課題 ウイルス 59: 155-166, 2009.
- 2) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H: Intraspecies transmission of L-type-like Bovine Spongiform Encephalopathy detected in Japan. Microbiol Immunol, 53: 704-707, 2009.

##### 2. 学会発表

- 1) 田中正彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎、仁科博史、前濱朝彦: A novel co-culture system for efficient PrP<sup>Sc</sup> transmission. 日本生化学会第82回年会 2009年10月、神戸.
- 2) 原英之、中村優子、萩原健一: Molecular mechanism for conformational change of PrP in prion infectivity. 日本分子生物学会 第32回年会 2009年12月、横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

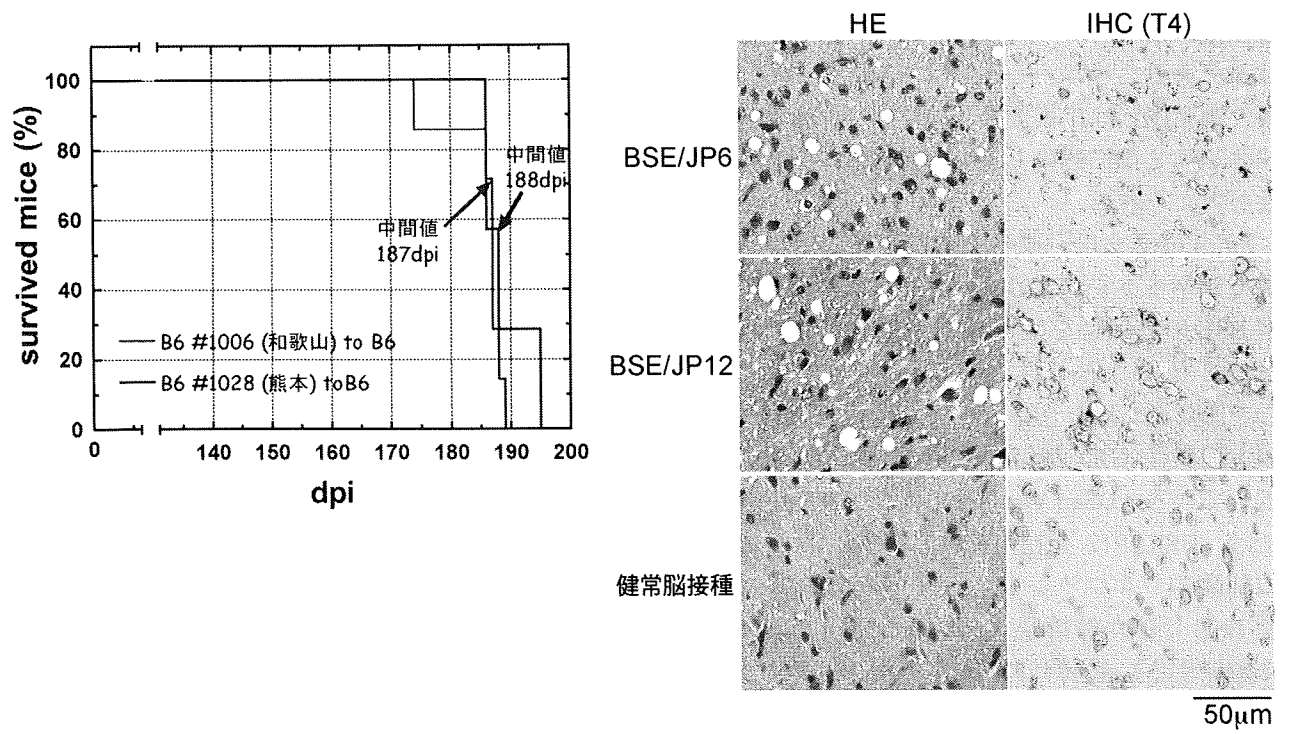


図1 BSE/JP6 (和歌山) と BSE/JP12 (熊本) を C57BL/6 マウスへ3代継代した際の生存曲線と視床の病理像



## 5. プリオン感染における腸管リンパ組織と免疫系細胞の役割の研究

研究分担者 石黒 直隆 岐阜大学応用生物科学部 獣医学課程 教授

研究要旨 牛海綿状脳症などの動物プリオン病は、経口的に摂取されたプリオン (PrP<sup>Sc</sup>) が、回腸遠位部から取り込まれ免疫系細胞にて増幅後、神経系に移行して発症すると考えている。しかし、回腸のどの細胞に取り込まれて増幅するかは不明である。そこで、子牛の回腸ループを作成して大腸菌で合成した rMPrP を注入後、経時的に注入した rMPrP の蓄積部位や蓄積量を免疫組織化学的に解析した。その結果、回腸のドーム領域や粘膜下領域では樹状細胞やマクロファージが rMPrP を捕食していることが明らかとなった。また、取り込まれた rMPrP の一部はマクロファージにより濾胞内へ移入されるが、多くは濾胞間を通してリンパ経路へ移行することが示された。回腸ループを用いた rMPrP の局在解析は、細胞内に取り込まれたプリオンの動態を調べる上で参考となる。また、マクロファージ内では PrP<sup>Sc</sup> を取り込んだ後、分解されることから、マクロファージ内での PrP<sup>Sc</sup> の分解機構を各種阻害剤を用いて解析した。その結果、マクロファージ内に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> は、リソソーム系とプロテアソーム系の両方により分解されることが明らかとなった。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) やスクレイピーなどの動物プリオン病は、経口的に摂取されたプリオン (PrP<sup>Sc</sup>) が回腸遠位部より細胞内に取り込まれ免疫系から神経系に移行することにより発症すると考えられている。回腸遠位部から生体内に取り込まれたプリオンが免疫系のどの細胞に取り込まれて蓄積するか、また、どのように免疫系の細胞から神経系細胞に伝達するかは不明である。特に、プリオン病では生体内に進入したプリオンが長い年月を経て中枢神経系に移行することから、腸管細胞内に取り込まれたプリオンの局在と分布を追跡することは極めて困難である。従ってプリオン病の発症機序の中で、生体内進入と神経移行の部分は、未だ解析されていない課題である。そこで、本研究ではプリオンとアミノ酸配列が同じ正常プリオン蛋白質 (rMPrP: リコンビナントマウスプリオン蛋白質) を大腸菌内にて合成し回腸ループに投与することにより、rMPrP を捕食する免疫系細胞の種類や蓄積部位を明らかにしてプリオン感染時の腸管細胞内でのプリオンの動態を解析しようと試みた。反芻獣におけるプリオンの取り込みは、幼弱な動物において旺盛であることから、回腸ループを用いた今回の実験も新生牛と2ヶ月齢牛を用いて比較した。

また、免疫系細胞に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> は細胞が有する分解機構により分解されることが知ら

れている。牛の回腸遠位部には、パイエル板と呼ばれる免疫系組織が存在し、取り込まれた外来抗原が、樹状細胞やマクロファージに捕食されて分解されるか抗原として T 細胞に提示される。外来抗原を取り込んだ細胞は、リソソーム系とプロテアソーム系の分解経路にて分解するが、マクロファージによる PrP<sup>Sc</sup> の分解機構に関しては不明であった。本年度は、マウスのマクロファージ培養細胞に PrP<sup>Sc</sup> を添加後、リソソーム系分解阻害剤やプロテアソーム系分解阻害剤を用いてプリオンの分解がどちらの分解機構で起きるかを解析した。

### B. 研究方法

#### 1) 牛回腸ループの作成と rMPrP の投与

新生牛と2ヶ月齢の牛を麻酔下にて保定し、牛回腸遠位部に長さ10センチ程度のループを数ヶ所作成した。作成したループに生理的食塩水、Carbon Black、あるいはrMPrP(2mg程度)を注入し、回腸ループを腸管内に戻して養生した。試料を注入後、3時間、6時間、9時間、24時間後に、回腸ループを回収して腸管組織を採集した。腸管ループを用いた牛への投与実験は、牛に苦痛を与えないように配慮し、全て麻酔下にて実施した。

#### 2) 検査試料の採取と免疫組織化学的検査

回収した回腸ループは、腸管腔内の異物を生理

的食塩水で洗浄後、回腸組織を5ミリ角程度に細切し、OCTに封入後液体窒素にて急速冷凍して、試料切片を作成するまで-85℃の冷凍庫に保管した。免疫組織化学的検査に用いる切片は、凍結した腸管試料からクリオスタットにて5μの切片を作成した。

免疫組織化学検査に用いた抗牛マウスモノクローナル抗体は以下のものである。プリオン:31C6抗体;CD14抗体:CAM36A;CD68抗体:EBM;CD172a抗体:DH59B;CD11c抗体:BAQ153;CD21抗体:CC21。CD14抗体とCD68抗体とCD172a抗体はマクロファージのマーカーとして、CD11c抗体は樹状細胞のマーカーとして、CD21抗体は濾胞樹状細胞のマーカーとして用いた。免疫組織化学検査は、常法に従って実施し、細胞はヘマトキシリンで染色した。また、2種類の抗体を用いた2重染色も実施した。

### 3) マクロファージの培養と各種阻害試薬を用いた細胞内分解経路の解析

マウスの順化マクロファージ株 RAW 株と J774 株を本実験に使用した。両マクロファージ株とも DMEM 培地にて培養し、シャーレからの細胞の回収はピペットで強制的に回収した。

各種阻害剤を用いたプリオン分解阻害試験は、以下の方法にて行った。マクロファージ株 RAW および J774 を6センチシャーレにて培養後、10% 脳乳剤を20マイクロ添加して4時間培養して PrP<sup>Sc</sup> を取り込ませた後、細胞を洗浄して細胞内に取り込まれていないプリオンを除いた。PrP<sup>Sc</sup> 感染細胞を洗浄後、各種分解阻害剤を添加することにより、マクロファージによる PrP<sup>Sc</sup> の阻害効果を経時的に解析した。マクロファージ内での PrP<sup>Sc</sup> の分解性と各種阻害剤による分解性の阻害効果は、経時的に採取した試料内の PrP<sup>Sc</sup> 量をウェスタンブロット解析することにより比較解析した。本研究で使用したプロテアソーム阻害剤は、MG132 と ALLN であり、リソソーム阻害剤は Leupeptin と E64d である。各阻害剤添加後、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間後の PrP<sup>Sc</sup> の分解度を阻害剤を添加していない検体と比較して、マクロファージでの PrP<sup>Sc</sup> の分解経路を推測した。

### 4) 共焦点顕微鏡を用いたマクロファージ細胞内での PrP<sup>Sc</sup> の局在解析

マクロファージ RAW 株と J774 株が取り込んだ

PrP<sup>Sc</sup> が細胞内のどの部位で分解するかを明らかにする目的で、マクロファージに PrP<sup>Sc</sup> を添加後、プロテアソームマーカーであるユビキチンとリソソームマーカーである Lamp1 に対する抗体を用いて PrP<sup>Sc</sup> との共局在を解析した。また、各種阻害剤添加後での PrP<sup>Sc</sup> との局在についても同様に解析した。

### (倫理面への配慮)

牛回腸ループへの各種試料の投与実験と回腸組織の採材に関しては、岐阜大学応用生物科学部の実験動物委員会の許可の基に行った。また、プリオンを用いた実験は全て P3 レベルの施設にて行った。したがって倫理上問題はない。

## C. 研究結果

### 1) 牛回腸遠位部における免疫系細胞の分布

新生牛および2ヶ月齢牛での回腸遠位部のパイエル板周囲における免疫系細胞の分布に関して各種 CD 抗体を用いて解析した。その結果、新生牛では、CD11c 陽性細胞と CD14 陽性細胞はドームから粘膜下組織に広く分布しており、2ヶ月齢牛より顕著な高発現が観察された、CD68 陽性や CD172a 陽性を示すマクロファージ細胞は粘膜下領域から濾胞内に広く分布していた。CD21 陽性細胞は、濾胞内に広く分布しており、濾胞樹状細胞の分布と一致した。CD68 陽性や CD172a 陽性を示すマクロファージ細胞や CD21 陽性の濾胞樹状細胞は、全般的に新生牛に比べて2ヶ月齢で高発現を示していた。回腸ループ内に注入した生理的食塩水と Carbon Black では、CD 抗原の発現に大きな差は見られなかった (図1)。

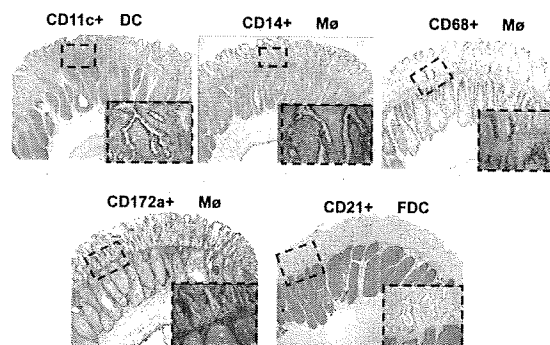


図1. 牛回腸での免疫系細胞の分布

### 2) 回腸に取り込まれて rMPrP の局在と分布

回腸パイエル板に取り込まれた rMPrP は、時間の経過に伴い、絨毛、ドーム、粘膜下組織、濾胞、濾胞間、しょう膜下組織へと移動することが明らか

かとなった。経時的に観察した場合、回腸での物質取り込みは6時間～9時間がピークであった。ドームと粘膜下組織での rMPPrP の蓄積は顕著であり、粘膜下組織から濾胞に移行することにより取り込んだ rMPPrP は塊を形成し、濾胞間を下降してしょう膜へと移動していた。取り込んだ rMPPrP の濾胞内への移行は低分子のみであり、高分子化した rMPPrP 塊の濾胞内移動は観察されなかった (図 2)。

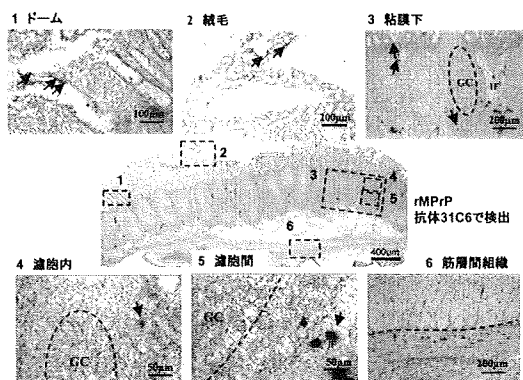


図 2. 回腸での rMPPrP の分布と局在

### 3) 免疫系細胞内での rMPPrP の局在

回腸に取り込まれた rMPPrP が、免疫系のどの細胞により捕食されているかを明らかにする目的で、rMPPrP 分子と CD 陽性細胞との局在を解析した。ドームでの免疫系細胞と rMPPrP 分子の局在を図 3 に示した。

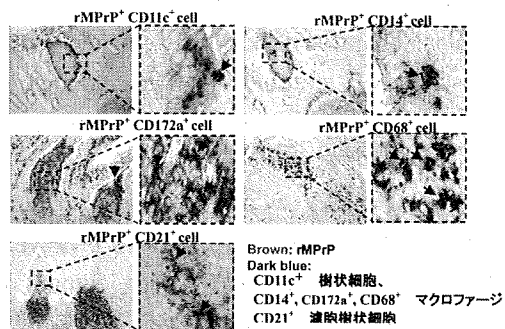


図 3. ドーム領域での rMPPrP と CD 陽性細胞との局在

ドーム領域では CD11c 陽性細胞と CD172a 陽性細胞と CD68 陽性細胞が rMPPrP を高率に捕食していることが二重染色により明らかとなった。ドーム内での CD21 陽性細胞はわずかであった。

濾胞内では、CD14 陽性細胞、CD172a 陽性細胞、CD68 陽性細胞で rMPPrP の共局在が観察された。また、CD21 陽性細胞では濾胞樹状細胞の特徴的な形態が観察されると共に、rMPPrP との局在も顕著であった。

濾胞間での rMPPrP と CD 陽性細胞の局在は顕著ではなく、CD11c 陽性細胞で一部に共局在が観察された他は、CD 陽性細胞とは孤立した形で細胞間を塊を作って移動している像が観察された。

回腸での免疫系細胞と取り込まれた rMPPrP との分布を表 1 にまとめた。この表をみるかぎり、ドームにて rMPPrP を取り込んでいる細胞は、マクロファージや樹状細胞であるが、濾胞内では主に濾胞樹状細胞とマクロファージが、濾胞間では樹状細胞が rMPPrP 分子を捕食していることが、明らかとなった。

表 1 rMPPrP を取り込んだ免疫系細胞

Antibodies	絨毛		ドーム		濾胞間		濾胞内	
	rMPPrP	発現・分布	rMPPrP	発現・分布	rMPPrP	発現・分布	rMPPrP	発現・分布
Me (CD68)	++*	++*	+	+++	-	+	+++	+++
Mo (CD172a)	++	+++	++	+++	+	+++	+	+
Mo (CD14)	+	+	+	+++	-	+	++	++
DC (CD11c)	+	+	+	+++	+	+	+	++
FDc (CD21)	-	+	+	+	-	+	+++	+++

\*: Top of the villi. The epithelium cells of dome

-: non or rare ; +: slight/few to moderate; ++: moderate; +++: strong/numerous

### 4) 各種阻害剤を用いたマクロファージでのプリオンの分解機構の解析

マウスマクロファージ細胞に PrP<sup>Sc</sup> を取り込ませた後、プロテアソーム阻害剤 (MG132 と ALLN) およびリソソーム阻害剤 (Leupeptin と E64d) を添加して、プリオン分解の阻害効果を検討した。チャンドラー株の PrP<sup>Sc</sup> を添加して検討したところ、阻害剤を添加しない細胞では PrP<sup>Sc</sup> の一過性の増幅が検出されるが、プロテアソーム阻害剤ではこうした増幅は抑制されていることがわかった。リソソーム阻害剤の添加では、一過性の増幅阻害もなく一様に阻害効果が観察された (図 4)。

各種阻害剤添加 48 時間後での分解阻害効果は、顕著であった。

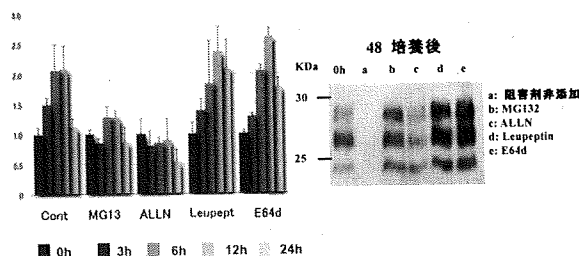


図 4. 各種阻害剤による PrP<sup>Sc</sup> 分解阻害効果

帯広株を用いた場合では、チャンドラー株にみ

られたような一過性の増幅は観察されなかった。プロテアソーム阻害剤およびリソソーム阻害剤ともマクロファージでの PrP<sup>Sc</sup> の分解を阻害した。これらの結果から、マクロファージ内での PrP<sup>Sc</sup> の分解はプロテアソーム系とリソソーム系の両方によりなされている可能性が示唆された。

#### 5) 細胞内での PrP<sup>Sc</sup> の局在

マクロファージ内に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> の細胞内局在を明らかにする目的で、プロテアソームのマーカーとして抗ユビキチン抗体をリソソームマーカーとして Lamp-1 抗体を用いて PrP<sup>Sc</sup> の局在解析を行った。その結果、マクロファージ内の PrP<sup>Sc</sup> はユビキチンや Lamp-1 と共局在を示し、細胞内に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> が両分解経路により分解されていることを示した。

#### D. 考 察

本研究では、腸管内に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> がどのような細胞により捕食され、移動し、局在するかを明らかにする目的で、PrP<sup>Sc</sup> とアミノ酸レベルが同じ rMPrP を牛の回腸ループに投与することにより、プリオン感染時の腸管でのプリオンの動態を推測しようと試みた。今回、プリオンではなく rMPrP を用いた理由には、プリオンを生体牛の腸管に投与することが、施設の制約上困難であること、さらに投与されるプリオン量が少なくトレースには困難であることが挙げられる。また、新生牛と2ヶ月齢牛を比較することにより、腸管免疫系組織の発達具合とプリオンの取り込み能の違いを明らかにしようとした。今回の回腸ループを用いた解析により、絨毛とドーム領域では樹状細胞とマクロファージが投与した rMPrP を捕食しており、外来抗原を効率的に処理していることが明らかとなった。また、ドームや粘膜下領域で捕食された rMPrP は樹状細胞により濾胞間を移動して移動することが明らかとなった。さらに、濾胞内への rMPrP の移行はマクロファージによりなされており、濾胞内には濾胞樹状細胞に捕食された rMPrP 分子も観察された。

マクロファージ内での PrP<sup>Sc</sup> の分解機構に関しても各種阻害剤を用いて解析した。その結果、帯広株を用いた場合は、プロテアソーム系とリソソーム系の両方で分解されていることが明らかとなった。一方、チャンドラー株を用いた場合は、プロテアソーム系では増幅阻害が起きているのと比べて、リソソーム系では分解機構そのもの

の阻害が観察された。マクロファージでのプリオン分解能の複雑さを示した。また、細胞内に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> の局在は、プロテアソーム系とリソソーム系に特異的な抗原に対する抗体を用いた共焦点顕微鏡観察により共局在していることが確認された。

#### E. 結 論

腸管に取り込まれたプリオンの動態を解析する目的で、プリオンに似た rMPrP を回腸ループに投与して、rMPrP の捕食細胞の種類と局在を解析した。腸管内に取り込まれた rMPrP は、ドームや粘膜下組織で樹状細胞やマクロファージに取り込まれることを明らかにした、また、濾胞内ではマクロファージと濾胞樹状細胞が rMPrP を捕食していることを示した。

マクロファージ内での PrP<sup>Sc</sup> の分解は、プロテアソーム系とリソソーム系の両方でなされていることを各種阻害剤を用いて実験で明らかにした。また、プリオン株により分解機構は多少異なることが示唆された。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishiguro N, Inoshima Y, Sassa Y, Takahashi T: Molecular characterization of chicken prion proteins by C-terminal-specific monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:402-406, 2009.
- 2) Lwin S, Inoshima Y, Ueno H, Ishiguro N: Uptake and transport of foreign particles in Peyer's patches of both distal ileum and jejunum of calves. *Cell tissue Res.* 337:125-135, 2009.
- 3) Atoji Y, Ishiguro N: Distribution of cellular prion protein in the central nervous system of the chicken. *J Chem Neuroanatomy* 38: 292-301, 2009
- 4) Lwin S, Inoshima Y, Atoji Y, Ueno H, Ishiguro N: Immune cell types involved in early uptake and transport of recombinant mouse prion protein in Peyer's patches of calves. *Cell Tissue Res.* 338:343-354, 2009.
- 5) Sassa Y, Inoshima Y, Ishiguro N: Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE