

201234018A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品を介する伝達性海綿状脳症の リスクと対策等に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

(北海道大学大学院獣医学研究科)

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品を介する伝達性海綿状脳症の リスクと対策等に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

(北海道大学大学院獣医学研究科)

平成 24 年度 食品の安全確保推進研究事業
「食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクと対策等に関する研究」班
班員名簿

堀内 基広	北海道大学・大学院獣医学研究科・獣医衛生学教室	教授
新 竜一郎	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野	准教授
北本 哲之	東北大学・大学院医学系研究科・病態神経学分野	教授
坂口 末廣	徳島大学・疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門	教授
柴田 宏昭	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	プロジェクト研究員
堂浦 克美	東北大学・大学院医学系研究科・神経化学分野	教授
飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
萩原 健一	国立感染症研究所・細胞生化学部	第 1 室室長
福田 茂夫	北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部畜産工学グループ	研究主任
室井 喜景	帯広畜産大学畜産学部・基礎獣医学研究部門	助教
村山 裕一	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・プリオン病研究センター	上席研究員
横山 隆	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・プリオン病研究センター	領域長補佐

目次

I.	総括研究報告書（平成 24 年度）	
	食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクと対策等に関する研究	1
	研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
II.	分担研究報告書	
1.	プリオン感染マウスにおけるミクログリア活性化状態の解析	9
	研究分担者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
2.	食品および原材料に応用可能な高感度プリオン検出技術の開発と BSE の感染病態・増殖機構の解明	16
	研究分担者 新 竜一郎（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）	
3.	ヒト型プリオン蛋白ノックインマウスを用いた vCJD プリオンの感染実験	20
	研究分担者 北本 哲之（東北大学・大学院医学系研究・病態神経学分野）	
4.	プリオン蛋白は Cargo Receptor の Sortilin と結合する	23
	研究分担者 坂口 末廣（徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門）	
5.	カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価	27
	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）	
6.	プリオン形成に関わる体内因子の解析	33
	研究分担者 堂浦 克美（東北大学・大学院医学系研究・神経化学分野）	
7.	プリオンの細胞および組織における病理学的研究	36
	研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）	
8.	定型および非定型 BSE プリオンの蛋白質化学的比較解析	41
	研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）	
9.	非定型 BSE 感染牛の臨床症状の客観的評価法の確立と非定型 BSE 感染牛の病態解析	45
	研究分担者 福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部）	
10.	プリオン感染動物における母子感染モデルの検討	49
	研究分担者 室井喜景（帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門）	

11.	異常型プリオン蛋白増幅法（PMCA）を用いた BSE 感染動物の病態解析・・・・・・・・・・	53
	研究分担者 村山 裕一（動物衛生研究所・プリオン病研究センター）	
12.	BSE 病態を反映する実験動物モデルの作出と評価・・・・・・・・・・	57
	研究分担者 横山 隆（動物衛生研究所・プリオン病研究センター）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・	63
IV.	研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・	69
V.	平成 24 年度活動状況・・・・・・・・・・	275

I. 総括研究報告書

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクと対策等に関する研究
（H 2 3 -食品一般-0 0 5）

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科

研究要旨

英国に端を発した定型 BSE は、適切な管理措置により発生数は減少している。一方、伝達性海綿状脳症のサーベイランスの強化により、従来の定型 BSE とは異なる非定型 BSE や非定型スクレイピーの存在が明らかとなった。定型 BSE の発生は管理下にあるが、食の安全安心に関して未だ社会的関心が高いこと、非定型 BSE や我が国に存在しない動物プリオン病への対策が必要なこと、プリオンの伝播機構や病態機序が解明されていないことが不安要素となっていることから、本研究班では、平成 23 年度から、1) 非定型 BSE および動物プリオン病のヒトへのリスクの解明、2) BSE の起源の推定、3) プリオンの伝播・増殖機構および神経変性機構・発病機構の解明、4) 我が国に存在しない動物プリオン病への対策整備、の 4 項目について研究を開始した。平成 24 年度は長期間が必要な動物実験を継続するとともに、以下に述べる研究成果が得られた。

非定型 BSE 感染ウシの臨床症状の観察と記録を継続し、脳内接種後 14 ヶ月より、走行時に若干の後肢の蹠踉が見られ、発病初期の臨床症状は不明瞭であるが、急速に進行して病末期に陥る経過をたどることを確認した。しかし、発病初期では臨床症状検査に対する顕著な反応は認められず、客観的な臨床症状の評価は困難であった。非定型 BSE の経口感染による人へのリスクの解析を進めるため、サルに非定型 BSE 牛脳乳剤を経口投与し、行動観察を開始した。霊長類の感染モデル系を確立するために、定型 BSE (2 継代目) および非定型 BSE (1 継代目) の連続継代を開始し、定期的に、血液、尿、唾液、脳脊髄液の採取を実施した。定型 BSE 感染サルで尿中に微量の PrP^{Sc} が検出されることから、プリオン病の生前診断に尿が応用できる可能性が示唆された。

Real-time QUIC 法を用いて非定型 BSE の PrP^{Sc} を高感度に検出することが可能となった。定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅する連続 PMCA 法では、非定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅できず、real-time QUIC 法では、組み換えヒト PrP (rHuPrP) を用いた場合、非定型 BSE の PrP^{Sc} のみが増幅可能であった。従って、これらを組み合わせることで、定型 BSE と非定型 BSE の PrP^{Sc} を区別して増幅することが可能となった。

プリオン病の病態進行に伴うミクログリアの遺伝子発現変化を詳細に解析し、ミクログリアが神経保護から炎症促進性・組織傷害性の活性化状態にシフトすることを明らかにした。大脳皮質由来初代培養神経細胞では、プリオン感染動物の脳と同様に、プリオンの増殖に伴い前シナプスマーカーや微小管構成タンパク質の発現低下が生じることから、プリオン感染に伴う神経変性の培養細胞モデルとなると考えられた。

スクレイピーと CWD の OIE リファレンスラボである、カナダ食品検査庁オタワラボを訪問して情報交換を行った。その中で、CWD と非定型スクレイピーに関して、特徴的な陽性像や判定の難しい陰性像などを集録した標準標本の資料を作成して、我が国でのモニタリングに活用する必要性を認識した。次年度に再度訪問して、資料作成を進める。

研究分担者

新 竜一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野・准教授）

北本 哲之（東北大学大学院医学系研究科・病態神経学分野・教授）

坂口 末廣（徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門・教授）

柴田 宏昭（独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・プロジェクト研究員）

堂浦 克美（東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野・教授）

飛梅 実（国立感染症研究所感染病理部・主任研究官）

萩原 健一（国立感染症研究所細胞生化学部・第1室室長）

福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場基盤研究部畜産工学グループ・研究主任）

室井 喜景（帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学研究部門・助教）

村山 裕一（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・プリオン病研究センター・上席研究員）

横山 隆（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・プリオン病研究センター・領域長補佐）

A. 研究目的

大きな社会問題となった定型 BSE は、飼料規制などの管理措置により発生は減少している。しかし、非定型 BSE、非定型スクレイピー、鹿の慢性消耗病など、性質が良くわかっていない伝達性海綿状脳症（プリオン病）が存在する。これら動物プリオン病の性状解析は、ヒトおよび動物への感

染リスクを明らかにして拡大防止対策を講じる上で重要である。また、プリオン病の感染・発病機構は依然として不明な点が多く、その解明は感染リスクの低減、および予防・治療法の開発に寄与する重要な課題である。また、北米や韓国で問題となっている鹿の慢性消耗病やヨーロッパで相次いで発見されている非定型スクレイピーなど我が国に存在しない伝達性海綿状脳症への対策にも備える必要がある。

これまでの研究では、定型 BSE プリオンの性質と病気の特性の解明、診断法の開発と改良などを通じて、食品を介する BSE リスクの評価に必要な科学的知見の提示、およびリスクの低減に貢献してきた。しかし、新たなプリオン病の出現、発病機構が依然として不明なことなど、プリオン病に対する不安を払拭できない要素が残されていることから、さらなる研究の継続が必要である。

そこで本研究では、1) 非定型 BSE の病態および動物プリオン病のヒトへの感染リスクの解明、2) BSE の起源の推定、3) プリオンの伝播・増殖機構および神経変性機構・発病機構の解明、4) 我が国に存在しない動物プリオン病への対策整備、の4項目について研究を進める。

研究成果は、非定型 BSE や他のプリオン病の発生原因、病原学的特性、およびヒトや他の動物への伝播性などの科学的知見に基づいた、適切な管理措置の策定に貢献できる。また、プリオン汚染飼料、食品・薬粧品原料の排除による感染拡大リスクの低減に寄与する。従って、より高いレベルで食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクの排除が可能となること、また、国内で発生が確認されていない伝達性海綿状脳症に対する不安を払拭できることから、伝達性海綿状脳症のリスクに関する食品の安全確保、および食品衛生行政に大きく貢献する。さらに、ヒトプリオン病の早期診断法の確立、治療法の開発に必要な基礎知見を提供することから、食品衛生の分野のみならず広く厚生労働行政に貢献する。

B. 研究方法

(1) 非定型 BSE の病態および動物プリオン病のヒトへの感染リスクの解明

非定型 BSE 接種牛（平成 23 年接種）の臨床症状の詳細な記録、歩数計による行動量の測定、聴

性脳幹反応測定を行い、非定型 BSE の臨床症状の客観的評価基準を作成する。また、啓蒙活動用に臨床症状の映像を記録する。非定型 BSE 接種牛の病変分布を、定型 BSE 感染牛と比較解析する。非定型 BSE 感染牛脳乳剤を接種したカニクイザルの、脳波測定、高次脳機能評価試験を行い、MRI 所見を解析する。PMCA 法により BSE 感染サルにおけるプリオンの時間的・空間的分布を解析する。ヒトの非定型 BSE への感受性を推定するために、ヒト各種 PrP(129M, 129V, 219K, 219E)を発現するノックインマウスに非定型 BSE を接種する。非定型 BSE 由来 PrP^{Sc}を増幅するための QUIC 法を確立する。PMCA 法および QUIC 法の PrP^{Sc}検出の定量的解析法を検討する。

(2) BSE の起源の推定

BSE の PrP^{Sc}をシードとして、種の異なる PrP^Cを基質とした PMCA および QUIC 法を行い、産生された PrP^{Sc}の分子特性を解析する。定型および非定型 BSE の異種動物への連続伝播実験を行い、産生された PrP^{Sc}の糖鎖組成や蛋白分解酵素切断部位などの生化学的特性を比較解析する。非定型 BSE 牛の脳乳剤を、種々の水分、油分および温度条件下で熱処理を行い、連続 PMCA 法および QUIC 法により増幅して、産生される PrP^{Sc}の分子性状を解析する。

(3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

プリオン感染動物脳における自然免疫系の反応の解析から、プリオンの増殖に応答するミクログリアとアストロサイトの機能と発病の関係を解明する。BSE プリオンが、他のプリオン株と異なり、分化神経幹細胞由来の神経細胞に親和性が高いことを見いだしたので、BSE プリオンの神経細胞親和性の機構を解析する。抗プリオン活性を有する新規化合物グリコシド 9 を予防・治療法の開発に役立てる。細胞死に関与するシグナル伝達経路の解析からプリオン感染に伴う細胞脆弱性を解析する。

(4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

カナダ、アメリカ、ノルウェイおよび韓国の研究機関から CWD あるいは非定型スクレイピーの発生状況について定期的に情報を収集する。同時

に文献情報の整理も行う。カナダ食品検査庁に赴き、直腸バイオプシーによる CWD 生前診断法を習得する。また、CWD モニタリングに関して、鹿簡易と殺場と連携して CWD モニタリングと PrP 遺伝子解析を継続する。

(倫理面への配慮)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコル等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱いは、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) 非定型 BSE の病態および動物プリオン病のヒトへの感染リスクの解明

1-1) 昨年度脳内接種を行った、非定型 BSE (L-BSE : BSE/JP24) (n=2) および定型 BSE (BSE/JP05) (n=1) の観察を継続した。非定型 BSE 脳内接種牛の臨床症状の観察と記録を継続しており、脳内接種後 14 ヶ月より、走行時に若干の後肢の蹠蹠が見られたが、その他の臨床症状検査に対する顕著な反応は認められなかった。発病初期の臨床症状は不明瞭であるが、急速に進行して、病末期に陥る経過を示した。脳内接種後 6~15 ヶ月における BAEP 測定値を解析したところ、接種後月数の経過にともなう BAEP 各波の測定値に変化はなかった。また、非定型 BSE 脳内接種牛 2 頭を、接種後 15 ヶ月で病理解剖し、脳組織全域における高度の PrP^{Sc}の蓄積を確認した。

1-2) BSE のヒトでの感染動態とリスクの解析、および BSE 感染霊長類モデルの確立のため、今年度は新たに定型 BSE 3 代目継代および L-BSE 2 代目継代の脳内接種を実施した。また、これまでに脳内接種を行い、1 年以上経過を観察した群では全てのサルで神経症状が認められ、安楽死後病理組織検索により、プリオン病の発症を確認した。L-BSE の経口ルートによるヒトへのリスクを解析するために、L-BSE を経口投与したサルの経過観察を継続している。

定型 BSE 感染サルの血液を輸血後、約 5 年を経過した未発症サルにおける PrP^{Sc}体内分布を

PMCA 産物を希釈・再増幅を繰り返す連続 PMCA 法により解析した。その結果、頭頂葉髄質、脊髄頸部神経根、座骨神経、鼠径リンパ節から PrP^{Sc} が検出された。従って、このサルでは感染が成立しており、PrP^{Sc} はすでに中枢に到達していたと考えられる。PrP^{Sc} 量はいずれも BSE 感染脳乳剤の 10⁻¹⁰~10⁻⁹ 希釈に相当すると考えられた。

定型 BSE 牛脳乳剤を経口投与後、7年を経過した未発症サルの解剖時に採取した体液類を濃縮し、連続 PMCA 法で解析したところ、尿から4ラウンド以降、PrP^{Sc} が検出された。尿中には 10⁻¹² ~ 10⁻¹¹ に相当する PrP^{Sc} が排泄されていたと推定された。この結果は、尿が生前診断に応用できる可能性を示している。また、これらの2例は、受動的暴露によるプリオン感染リスクの評価および病態解析のためには、5年以上の長期間にわたるサルの飼育が必要であることを示している。

1-3) PMCA 法の定量的解釈法が進み、連続 PMCA 法ではじめて検出されるような微量の PrP^{Sc} 量を感染脳に存在する PrP^{Sc} に対する相対値で表現することが可能となった。

2) BSE の起源の推定

2-1) *in vitro* の試験系を応用して非定型 BSE が定型 BSE の起源であることを推定するために、*in vitro* の PrP^{Sc} 増幅系を用いて、定型 BSE の PrP^{Sc} と非定型 BSE の PrP^{Sc} を区別する方法について検討した。定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅する連続 PMCA 法では、非定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅できないことが判り、定型 BSE の PrP^{Sc} の選択的増幅法として利用できることが判明した。一方、*real-time* QUIC 法では、組み換えウシ PrP (rBoPrP) を基質とした場合は、感度の違いはあるものの、定型 BSE、非定型 BSE の PrP^{Sc} の両方を検出できるが、組み換えヒト PrP (rHuPrP) を用いた場合、非定型 BSE の PrP^{Sc} のみが増幅可能であった。従って、PMCA 法と *real-time* QUIC 法を組み合わせることで、定型 BSE と非定型 BSE の PrP^{Sc} を区別して増幅可能となる。そこで平成 25 年度は、非定型 BSE 脳乳剤に対して熱処理や薬剤処理を行い、この方法を定型 BSE の起源の推定に活用する。

3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

3-1) プリオン感染に伴うミクログリアの活性化状態を解析した。プリオン感染マウス由来ミク

ログリアでは、感染初期の接種後 60 日では、NGF および BDNF など神経栄養因子の発現上昇が見られた。一方、感染の進行に伴い、接種後 90 日以降、TNF- α 、IL-12p40 および IL-1 β などの炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇が顕著となり、炎症抑制性の M2 マクロファージでの発現上昇が知られる YM-1、MRC-1、FIZZ-1 および CD163 の遺伝子発現は低下した。以上の結果から、ミクログリアは、プリオン感染の初期においては神経栄養因子などの分泌により神経保護的に機能するが、感染の進行とともに炎症促進性の活性化状態にシフトすることが示唆された。

3-2) プリオンが感染するとポストゴルジの小胞輸送が障害され、細胞膜蛋白質の細胞膜発現が抑制されることを見出した。この小胞輸送の障害は感染に伴う神経変性と関連する可能性があることから、さらに小胞輸送について解析した。Sortilin は VPS10P domain receptor family に属する Cargo receptor であり脳組織で多く発現する。プリオンが感染に伴い、Sortilin の蛋白量が低下したことから、プリオンが Sortilin の蛋白量を低下させ、細胞膜蛋白と Sortilin の結合を障害し、細胞膜蛋白の細胞膜への運搬を抑制する可能性が示唆された。

3-3) 新たなツールとして昨年度発見した Glycoside-9 について、プリオン感染細胞と非感染細胞で解析を進めたところ、Isg15、Oasl2、Cxcl10、Ccl5、Ifit1 などのインターフェロン誘導遺伝子群の mRNA 発現が Glycoside-9 により減少することが明らかとなった。そこで、各種インターフェロン (IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ) をプリオン感染細胞の培養上清に加えて PrP^{Sc} への影響を調べたところ、通常の培養では PrP^{Sc} に変化はなかったが、Glycoside-9 と共培養するといずれのインターフェロンでも濃度依存的に PrP^{Sc} 量の回復が観察された。以上のように、Glycoside-9 の作用の解析の過程で、インターフェロンシグナル伝達系とプリオン増殖との関連を見出した。

3-4) 大脳皮質由来初代培養神経細胞にプリオンを接種すると、プリオンの増殖に伴い前シナプスマーカーや微小管構成タンパク質の発現低下が生じた。プリオン感染動物の脳でも同様の変化が生じることから、大脳皮質由来初代培養神経細胞はプリオン感染に伴う神経変性の培養細胞モデルとなると考えられた。

4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

4-1) 北海道と本州に生息するシカの CWD モニタリングと PrP 遺伝子型の決定を行った。北海道では、道東および道央から、エゾシカ用簡易と殺場で処理された 51 頭を調べたが、CWD は陰性であった。また、このうち 4 頭のエゾシカの PrP 遺伝子多型を解析したが、アミノ酸型は²⁰Asp⁹⁵Gln⁹⁶Gly¹⁰⁰Ser¹¹⁶Ala¹³²M²²⁵Ser²²⁶Gln であり、アミノ酸多型は認められなかった。

4-2) スクレイピーと CWD の OIE リファレンスラボである、カナダ食品検査庁オタワラボを訪問して、CWD とスクレイピーのモニタリング体制について情報交換した。その中で、鹿科動物の延髄とリンパ系組織の免疫組織化標本、および非定型スクレイピーの中樞神経系における免疫組織化学標本については、特徴的な陽性像や判定の難しい陰性像などを集録した標準標本の資料を作成して、我が国でのモニタリングに活用する必要性を認識した。次年度に再度訪問して、資料作成を進める予定である。

D. 考察

非定型 BSE (L-BSE) 感染牛の臨床症状は、定型 BSE 感染牛ほど顕著ではなく、発病後の経過も早いことから、非定型 BSE 感染牛の臨床症状を的確に判断することは難しいと考えられた。啓蒙活動に資する映像の記録を継続するとともに、行動量や歩様の解析、聴性脳幹誘発電位の測定などを実施して、より客観的な指標の検討を行う必要がある。

非定型 BSE (L-BSE) の経口ルートによるヒトへのリスクを解析するために、L-BSE を経口投与したサル経過観察と採材を継続している。本年度、非定型 BSE を増幅可能な real-time QUIC 法が確立できたことから、発病前のサルの血液など採材可能な体液から PrP^{Sc} が検出されるかなど、生前診断法の可能性についてアプローチ可能になった。また、これまでに定型 BSE 感染サルで実施してきた行動解析や高次脳機能の解析を行い、非定型 BSE 感染サルにおける脳機能の異常の発現について知見を得る必要がある。

定型 BSE 牛脳乳剤を経口投与後、7 年を経過した未発症サルの解剖時に採取した尿から連続 PMCA 法により PrP^{Sc} が検出できたことから、尿

がプリオン病の生前診断に応用できる可能性が示唆された。また、ヒトのモデルとしてカニクイザルを用いて輸血や食を介するプリオン感染リスクを評価するためには、5 年以上の長期間にわたる解析が必要である。

非定型 BSE (L-BSE) の PrP^{Sc} が、定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅する連続 PMCA 法では増幅できないことは、定型 BSE と L-BSE の PrP^{Sc} の生物学的・生化学的性状が明らかに異なることを示している。興味深いことに、real-time QUIC 法では、rHuPrP を用いた場合、L-BSE の PrP^{Sc} のみが増幅可能であった。従って、PMCA 法と real-time QUIC 法の組み合わせることで、迅速な定型 BSE と L-BSE の鑑別が可能となる。また、L-BSE が定型 BSE の起源となる可能性を調べる方法としても利用価値が高いと考えられる。

本研究では、ミクログリアはプリオン感染の初期においては神経栄養因子などの分泌により神経保護的に機能するが、感染の進行とともに炎症促進性の活性化状態にシフトすることを明らかにした。しかし依然として、ミクログリアの活性化と神経変性の関係は明らかでない。プリオン感染動物の脳からミクログリアの分離が可能であり、また、大脳皮質由来初代培養神経細胞がプリオン感染に伴う神経変性の培養細胞モデルとなることから、ミクログリアとプリオン感染神経細胞の共培養系を構築することで、ミクログリアの神経変性への影響が解析できると考えられる。

また、プリオン持続感染細胞では、ポストゴルジの小胞輸送が障害され、細胞膜蛋白質の細胞膜発現が抑制されることを見出したが、この現象と神経変性の関係の解析を進める上でも、大脳皮質由来初代培養神経細胞は有用な細胞モデルであると思われる。

北海道ではエゾシカ肉の食用利用を促進する動きがあり、CWD の存在を懸念する意見が多いが、これまで、エゾシカで CWD 陽性個体は発見されていない。また、カナダ食品検査庁オタワラボを訪問して、鹿科動物の延髄とリンパ系組織の免疫組織化標本、および非定型スクレイピーの中樞神経系における免疫組織化学標本を観察した結果、ウエスタンプロットに頼るだけでなく、免疫組織化学の必要性を再認識した。来年度、研究員を派遣して特徴的な陽性像や判定の難しい陰性像などを集録した標準標本の資料を作成する予定である。

E. 結論

1) 非定型 BSE 感染脳内接種ウシは、接種後 14 ヶ月より、走行時に若干の後肢の蹠踉が見られ、発病初期の臨床症状は不明瞭であるが、急速に進行して病末期に陥る経過をたどることを確認した。非定型 BSE の経口感染による人へのリスクの解析を進めるため、サルに非定型 BSE 牛脳乳剤を経口投与し、行動観察と採材を継続している。また、プリオン病の生前診断に尿が応用できる可能性が示唆された。

2) 定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅する連続 PMCA 法では、非定型 BSE の PrP^{Sc} を効率良く増幅できず、real-time QUIC 法では、rHuPrP を用いた場合、非定型 BSE の PrP^{Sc} のみが増幅可能であった。従って、これらを組み合わせることで、定型 BSE と非定型 BSE の PrP^{Sc} を区別して増幅することが可能となった。

3) プリオン病の病態進行に伴い、ミクログリアが炎症促進性・組織傷害性の活性化状態にシフトすることを明らかにした。大脳皮質由来初代培養神経細胞が、プリオン感染に伴う神経変性の培養細胞モデルとなることを示した。

4) CWD と非定型スクレイピーに関して、特

徴的な陽性像や判定の難しい陰性像などを集録した標準標本の資料を作成して、我が国でのモニタリングに活用する必要性を認識した。次年度にカナダ食品検査庁を再訪問して、資料作成を進める。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

各研究分担者の報告書を参照

2. 学会発表

各研究分担者の報告書を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. プリオン感染マウスにおけるミクログリア 活性化状態の解析

研究分担者 堀内 基広 北海道大学大学院・獣医学研究科

研究協力者 蕪木 洋之 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

研究要旨

ミクログリアは神経組織で神経細胞の活性の監視、異物除去、自然免疫の調節などに関わる多機能細胞であり、その活性化状態により、神経保護的あるいは神経傷害的の両方に作用し得る。プリオン感染後、早期から PrP^{Sc} の蓄積が起こる部位に一致してミクログリアの活性化が認められるが、ミクログリアがどのようにプリオン病の病態機序に関与しているかは不明である。そこで本研究では、プリオン病の病態の進行に伴うミクログリアの活性化状態を詳細に解析することを目的とし、プリオン感染マウスの脳組織から CD11b 陽性ミクログリアを経時的に分離し、遺伝子発現解析を行った。プリオン感染マウス由来ミクログリアでは、感染初期の接種後 60 日では、NGF および BDNF など神経栄養因子の発現上昇が見られ、接種後 90 日では、プリオン病の病気の進行に抑制的に働くことが示唆されている CXCL10 の発現が一過性に上昇した。一方で、感染の進行に伴い、特に接種後 90 日以降、TNF- α 、IL-12p40 および IL-1 β などの炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇が顕著となり、炎症抑制性の M2 マクロファージでの発現上昇が知られる YM-1、MRC-1、FIZZ-1 および CD163 の遺伝子発現は低下した。これらの結果から、ミクログリアは、プリオン感染の初期においては神経栄養因子などの分泌により神経保護的に機能するが、感染の進行とともに炎症促進性の活性化状態にシフトすることが示唆された。

A. 研究目的

プリオン感染動物の脳組織における PrP^{Sc} の蓄積は、臨床症状を呈する前の感染後早い時期から観察され、その部位に一致してミクログリアの活性化が認められることから、ミクログリアがプリオン病の病変形成に大きく関与していると考えられる。

プリオン感染動物の脳では、T 細胞の浸潤を伴う炎症像は認められないが、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12p40、TGF- β 、chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)、chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)、prostaglandin (PG) E₂、iNOS、p22^{phox} などの、サイトカイン、ケモカイン、および免疫応答に関する遺伝子あるいはタンパク質の発現が上昇することから、自然免疫の活性状態は病態進行に影響すると考えられる。従って、脳内の自然免疫の役割を担うミクログリアは、プリオン病の病態機序に深く関与していると考えられてい

る。しかし、ミクログリアの機能解析や遺伝子発現に焦点を絞った研究は少なく、病態の進行に伴う経時的な観察も十分ではないため、プリオン病におけるミクログリアの活性化状態、および病態への影響に関する詳細は不明である。

そこで、密度勾配遠心分離法および免疫磁気分離法を用いて、脳組織からミクログリアを分離して、遺伝子発現を調べることにより、病態の進行に伴うミクログリアの活性化状態を詳細に解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) CD11b 陽性ミクログリアの分離

免疫磁気分離法による細胞の分離までの実験は酵素処理を除き全て氷上で行った。マウスをセボフルラン深麻酔下で安楽殺し、灌流を行い、脳を採材した。脳をハサミで細切し、HBSS を入れ

た 15 ml 遠心管に移し、4°C、300 × g、2 分間遠心した。上清を取り除いた後、Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて細胞を分離した。100 µl のセルストレイナー (BD Falcon) に細胞懸濁液を通し、残存する組織片を除去した。

上記のように細胞を分離した後、細胞懸濁液を 4°C、300 × g、5 分間遠心し、上清を除去した。沈殿を 4 ml の 31.5% Percoll で再懸濁した後、15 ml 遠心管に入れた 4 ml の 63% Percoll の上に重層した。その上に更に HBSS を 2 ml 重層し、4°C、1,000 × g、25 分間遠心した。遠心終了後、63% Percoll と 31.5% Percoll の間の層に存在する細胞を回収し、HBSS を加え Percoll を希釈し、4°C、400 × g、10 分間遠心した後、免疫磁気分離法に用いた。

密度勾配遠心法によって得られた細胞に、0.5% Fetal Bovine Serum (FBS) および 2 mM EDTA を含む PBS (FBS-EDTA-PBS) を 90 µl 加え懸濁した。10 µl の CD11b microbeads (Miltenyi Biotec, 130-049-601) を添加し、4°C で 15 分間反応させた。反応後 FBS-EDTA-PBS を加え、4°C、300 × g、10 分間遠心し、細胞と結合しなかった CD11b microbeads を含む上清を除去し、FBS-EDTA-PBS で懸濁した。MiniMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) にセットした MS Column (Miltenyi Biotec) に懸濁液をアプライし、さらに 500 µl の FBS-EDTA-PBS で 3 回 MS Column を洗浄した。このときに MS columns を通過した液をすべて回収し、CD11b microbeads に結合しなかった細胞集団を回収した。その後 MS column を MACS® Separator から取り除き、1 ml の FBS-EDTA-PBS を加えた後、プランジャーで押し出し CD11b microbeads に結合した CD11b 陽性の細胞集団を回収した。それぞれの回収液は HBSS を加え 4°C、300 × g、10 分間遠心後、上清を除去し細胞数を測定した。

2) フローサイトメトリー (FCM)

一次抗体の非特異的な結合および Fc レセプターを介した結合を防ぐために、分離した細胞を 5% FBS、抗 CD16/32 モノクローナル抗体 (1:100) を含む PBS で懸濁し、氷上で 30 分間静置した。反応後 96 穴プレートに分注し、プレートを 4°C、300 × g、5 分間遠心分離し、上清を除去した。0.5% FBS を含む PBS (FBS-PBS) を加え懸濁し、4°C、300 × g、5 分間で遠心分離し、細胞を洗浄した。上清を除去後、FBS-PBS で希釈した一次抗体希釈

液 100 µl を加え、細胞を懸濁した。一次抗体として、抗 CD11b 抗体を用い、陰性対照抗体としてラットの IgG 2b アイソタイプコントロール抗体を使用した。氷上で 30 分反応させた後、4°C、300 × g、5 分間遠心分離した。上清を除去し、FBS-PBS で 2 回細胞を洗浄した後、最後は PBS で細胞を洗浄した。細胞を 100 µl の propidium iodide (PI) 溶液 (5 µg/ml in PBS) に浮遊させ、EPICS XL-ADC flow cytometer (Beckman Coulter) を用いて解析した。

3) 定量 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA は Trizol Reagent (Invitrogen) を用いて回収した。cDNA は First-Strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare) を用いて合成した。37°C で 60 分間の逆転写反応を行った後、逆転写反応を 95°C、5 分間の加熱により停止した。cDNA は nuclease-free water で希釈し、その後の PCR に使用した。

mRNA の定量発現解析は TaqMan probe (Applied Biosystem) を用いた定量 PCR 法により行った。PCR の反応液は、合成した cDNA 2 µl, TaqMan Universal Master Mix 2, with UNG (Applied Biosystems) 10 µl および TaqMan probe and primer set 1 µl を混合し nuclease-free water で全量を 20 µl に調整した。ABI Prism 7900 HT systems (Applied Biosystems) を用いて PCR 反応を実施した。PCR 増幅産物の定量解析は ABI PRISM 7900 HT SDS 2.1 (Applied Biosystems) を用いて、DDCt 法により行った。内在性コントロールとして β-actin を使用した。本研究で用いた TaqMan probe に関する情報は表 2 に示した。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている (実験番号 2012-1-57, 58)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会にて承認された動物実験計画書 (実験番号 11-0062, 11-0063) に従って実施した。

C. 研究結果

1) CD11b 陽性細胞の分離

免疫磁気分離法により CD11b 陽性細胞が分離

できていることを確認するため、分離前後の細胞集団における CD11b 発現細胞の割合を FCM によって解析した (図 1)。分離前では、プリオン非感染マウスの脳から回収した細胞は、16%程度が CD11b 陽性だった。また、プリオン Chandler 株感染後 120 日のマウスから分離した細胞では、75%程度が CD11b 陽性となり、プリオン感染および非感染で程度の違いは見られるが、磁気ビーズにより分離する前の細胞集団は、CD11b 陰性の細胞を含む雑多なものであることがわかった。一方、CD11b microbeads による分離後、CD11b microbeads に結合した細胞集団 (bound fraction) では、非感染マウスおよび Chandler 株感染マウスから分離した細胞の両方で、90%以上の細胞が CD11b 陽性となり、CD11b microbeads に結合しなかった細胞集団 (pass through fraction) では、CD11b の発現は認められなかった。この結果から、免疫磁気分離法を行うことで、CD11b 陽性細胞が高い割合で分離できることが確認できた。

2) プリオン感染による炎症促進性の遺伝子発現の変化

プリオン感染マウスの脳からミクログリアを分離し、M1 および M2 マクロファージで発現が増加することが知られている遺伝子の発現を調べた。プリオン Chandler 株感染マウス、Obihiro 株感染マウスおよびプリオン非感染マウス脳乳剤接種後 60 日、90 日、120 日、145 日にそれぞれ CD11b 陽性ミクログリアを分離し、定量 RT-PCR によって mRNA の発現を解析した。

炎症反応を促進し、組織傷害性をもつ M1 マクロファージで発現が増加する遺伝子の、mRNA 発現量の変化を図 2 に示した。TNF- α および IL-12p40 遺伝子は特に顕著な発現上昇が見られた。TNF- α は、接種後 60 日では、Obihiro 株感染マウスでのみ非感染マウスに比べて遺伝子発現が上昇し、それ以降の期間では両プリオン株感染マウスで発現が上昇する傾向が見られた。IL-12p40 は、Chandler 株感染マウスでは接種後 60 日からすでに変化が見られ、それ以降の期間では両プリオン株感染マウスで遺伝子発現が上昇する傾向が見られた。TNF- α および IL-12p40 に比べると変化量は少ないが、IL-1 β もプリオン感染マウスで遺伝子発現が上昇し、Chandler 株感染マウスでは接種後 120 日および 145 日で、Obihiro 株感染マウスでは接種後 90 日および 145 日で有意に遺伝子発

現が増加した。

3) プリオン感染による炎症抑制性の遺伝子発現の変化

炎症反応の抑制、傷害を受けた細胞の貪食除去、増殖因子の発現などにより、組織の保護や創傷治癒の機能を持つ M2 マクロファージで発現が増加することが知られている遺伝子の mRNA 発現量の変化を図 3 に示した。

M2 マクロファージで発現が増加し、M2 マクロファージマーカーとして汎用される YM-1、MRC-1、FIZZ-1 および CD163 遺伝子の発現はプリオン感染により一様に発現が低下した。接種後 60 日では明らかな変化は確認できないが、90 日では全ての因子で発現の低下傾向が見られ、MRC-1、FIZZ-1 および CD163 遺伝子の発現は接種後 120 日および 145 日ではより顕著に発現が低下した。

4) 神経保護因子・栄養因子の遺伝子発現の変化

神経栄養因子として知られる nerve growth factor (NGF) は、接種後 60 日では Obihiro 株感染マウスで有意に遺伝子発現が増加し、Chandler 株感染マウスでも有意差は認められないが遺伝子発現が増加する傾向が見られた。しかし逆に、接種後 90 日では遺伝子発現が低下する傾向が見られ、120 日および 145 日では Chandler 株および Obihiro 株ともに有意に遺伝子発現が低下した。同じく神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は、Chandler 株感染マウス由来ミクログリアでは接種後 60 日で遺伝子発現が増加し、接種後 90 日以降では NGF と同様に遺伝子発現が低下した (図 4)。

CXCL10 は、接種後 60 日では Obihiro 株感染マウスでは変化が見られないが、Chandler 株感染マウスでは、非感染マウスに比べて有意に遺伝子発現が増加した。さらに接種後 90 日では、Chandler 株感染マウス、Obihiro 株感染マウスともに遺伝子発現が増加した。しかし、その後発現は低下し、接種後 120 日でも非感染マウスと比べると 2 倍程度の発現上昇がみられるものの、90 日と比べるとその傾向は弱まっており、145 日では非感染マウスと比べて差が認められなかった。

5) 大脳皮質由来初代培養神経細胞にプリオンを接種すると、プリオンの増殖に伴い前シナプスマ

ーカーや微小管構成タンパク質の発現低下が生じた。プリオン感染動物の脳でも同様の変化が生じることから、大脳皮質由来初代培養神経細胞はプリオン感染に伴う神経変性の培養細胞モデルとなると考えられた。

D. 考察

プリオン感染マウスの脳からミクログリアを分離し、経時的に遺伝子発現を解析したところ、ミクログリアの活性化が見られ始める接種後 60 日では、M1 マクロファージのマーカーとして汎用される TNF- α など炎症性サイトカインや、M2 マクロファージのマーカーとして汎用される YM-1、MRC-1 および FIZZ-1 などの因子については、明瞭な発現変化は見られなかったが、接種後 90 日以降ではこれらの遺伝子の発現に大きな変化が見られた。YM-1、FIZZ-1、MRC-1 および CD163 など、M2 タイプのマクロファージで発現上昇することが知られている遺伝子の発現が、接種後 90 日以降で一樣に発現が低下していた (図 3)。逆に M1 タイプのマクロファージで発現が亢進することが知られている TNF- α 、IL-12p40 および IL-1 β などの炎症性サイトカインは、増加が始まる時期は多少異なるものの、接種後の日数が経過するに伴い発現が増加した (図 2)。この結果は、プリオン感染の進行とともに、ミクログリアは炎症促進性の組織障害的な活性化状態を呈し、病変形成を進める方向に働くことを示唆している。しかし、プリオンを脳内接種した場合、野生型 (WT) マウスと、TNF- α や IL-12 の遺伝子欠損マウスでは生存期間に差が無いことから、プリオン病において、これらのサイトカインが直接神経傷害に関与する可能性は低いと考えられる。

ミクログリアは神経栄養因子である BDNF や NGF を産生することが知られ、これらの神経栄養因子は神経変性疾患で神経保護作用を発揮することから、プリオン病でも神経保護的に働く可能性がある。プリオン感染脳乳剤接種後 60 日のマウスから分離したミクログリアでは、Chandler 株感染マウスおよび Obihiro 株感染マウスの両方で NGF の mRNA 発現が非感染マウスに比べて増加しており、Chandler 株感染マウスでは BDNF の mRNA 発現も増加していた (図 4)。このことから、ミクログリアの活性化が起こり始める感染初期においては、ミクログリアは神経栄養因子の分泌

による神経保護的な作用を有している可能性が示唆される。しかし、ミクログリアが組織傷害性の活性化状態の遺伝子発現プロファイルを示す接種後 90 日以降においては、これら両神経栄養因子の遺伝子発現は非感染に比べて低下することから、感染中期から後期にかけてミクログリアの神経保護的機能が低下することが推察される。

CXCL10 は、Th1 サイトカインによって発現が誘導され、神経傷害性をもつ報告がある。一方では CXCL10 による神経保護作用も知られており³⁾、ウエストナイルウイルス感染症や、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalitis, EAE) を用いた研究では、CXCL10 が病気の進行に抑制的に働くことを示唆する結果が得られている。プリオン感染マウスの脳内でも CXCL10 の遺伝子やタンパク質の発現上昇が見られ、病態への関与が示唆される。特に、プリオン感染初期のマウスの脳で CXCL10 遺伝子の発現が上昇する。さらに、CXCL10 遺伝子欠損マウスにプリオン Chandler 株あるいは Obihiro 株を接種し、WT マウスと平均生存期間を比較した結果、Chandler 株を接種した場合、有意差は認められないが平均生存期間は短縮し、Obihiro 株を接種した場合は有意に平均生存期間の短縮が認められたことから、プリオン感染においては CXCL10 が神経保護的に働く可能性が示唆されている。今回、プリオン接種後 90 日において CXCL10 の mRNA 発現が一過性にかつ顕著に増加していたことから、ミクログリアがプリオン感染後早期の CXCL10 の増加に関与し、神経保護的に働く可能性が示唆される。

以上述べてきたように、プリオン感染初期から中期においては、ミクログリアは NGF や CXCL10 など神経保護機能を持つ因子の分泌等により、病態の進行抑制的に働く可能性が示唆される。しかし病態の進行とともにミクログリアは M1 タイプの活性化状態へと変化し、神経栄養因子などの発現減少により神経保護的機能が低下して、神経傷害作用が神経保護作用を上回り、神経へのダメージが相対的に大きくなるのが、プリオン病の神経変性機序の一因として考えられる。

E. 結論

プリオン感染マウス由来ミクログリアでは、感染初期の接種後 60 日では、NGF および BDNF な

ど神経栄養因子の発現上昇が見られた。一方、感染の進行に伴い、接種後 90 日以降、TNF- α 、IL-12p40 および IL-1 β などの炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇が顕著となり、炎症抑制性の M2 マクロファージでの発現上昇が知られる YM-1、MRC-1、FIZZ-1 および CD163 の遺伝子発現は低下した。以上の結果から、ミクログリアは、プリオン感染の初期においては神経栄養因子などの分泌により神経保護的に機能するが、感染の進行とともに炎症促進性の活性化状態にシフトすることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasebe, R., Raymond, G. J., Horiuchi, M., and Caughey, B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology*, 423: 205-213, 2012
- 2) Yoshikawa, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Kadohira, M., Kai, S., Mizusawa, H., Nagata, C., Onodera, T., Sata, T., Tsutsui, T., Yamada, M., and Yamamoto, S. Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74(8): 959-968, 2012
- 3) Nakato, G., Hase, K., Suzuki, M., Kimura, M., Ato, M., Tobiume, M., Horiuchi, M., Atarashi, R., Nishida, N., Watarai, M., Imaoka, K., and Ohno H. *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol.*, 189(4): 1540-1544, 2012.
- 4) Ohsawa, N., Song, C.-H., Suzuki, A., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol.*

Immunol. In press

2. 学会発表

- 1) Horiuchi, M., Yamasaki, T., Hasebe, R. and Takahashi, Y. Analysis of PrP^{Sc} accumulation and glial cell activation in brains of prion-infected mice at the early stage of infection. Prion2012 (May 10-12, 2012, Amsterdam, The Netherlands)
- 2) Sassa, Y., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R. and Horiuchi, M. A decreased expression of pre-synaptic markers in neurons in differentiated neurospheres infected with BSE-derived prion strain. Prion2012 (May 10-12, 2012, Amsterdam, The Netherlands)
- 3) Yamasaki, T. and Horiuchi, M. Characterization of intracellular trafficking of PrP^{Sc} for prion propagation in cells in the early stage of infection. Prion2012 (May 10-12, 2012, Amsterdam, The Netherlands)
- 4) Suzuki, A., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Construction of mAb132-EGFP fusion proteins as a PrP^{Sc}-specific probe. Asia Pacific Prion Symposium 2012 (July, 29-30, 2012, Yokoyama, Japan)
- 5) Yamasaki, T., Baron, G. and Horiuchi, M. Analysis of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrP^{Sc} in Neuro2a cells. Asia Pacific Prion Symposium 2012 (July, 29-30, 2012, Yokoyama, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

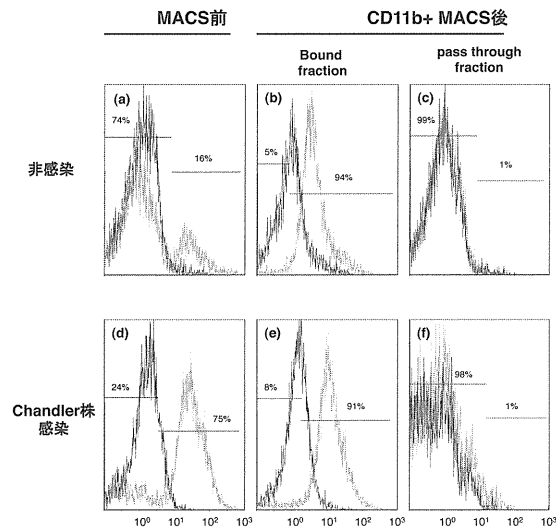


図 1. フローサイトメトリーによる CD11b の発現解析

免疫磁気分離法による CD11b 陽性細胞の分離を確認するため、プリオン非感染マウス (29~32 週齢)、およびプリオン Chandler 株接種後 120 日の感染マウスから細胞を分離し、抗 CD11b 抗体結合磁気ビーズを用いる免疫磁気分離法の前後の細胞を、それぞれ抗 CD11b 抗体で染色し、フローサイトメトリーによって CD11b の発現を解析した (赤色)。陰性対照としてアインタイプコントロール抗体を使用し、その結果を各ヒストグラム上に黒色で示した。図中の数字 (%) は CD11b 陽性および陰性細胞の割合を示す。

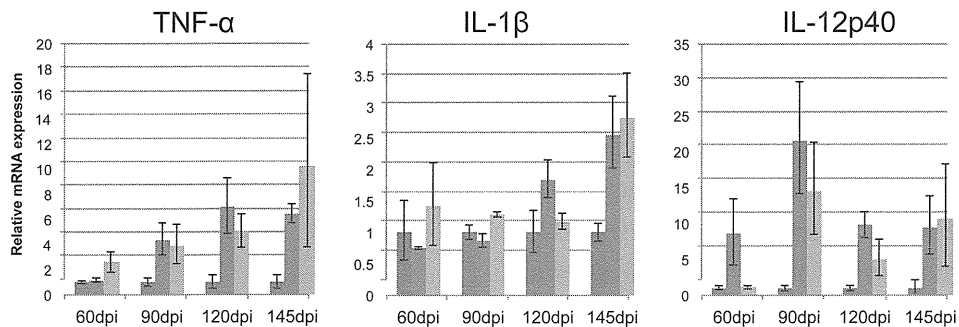


図 2. プリオン感染マウス由来マイクログリアにおける M1 タイプのマクロファージ/単球で発現が認められる遺伝子発現の変化

プリオン Chandler 株、Obihiro 株およびプリオン非感染脳乳剤接種後 60 日、90 日、120 日、145 日にそれぞれ CD11b 陽性マイクログリア細胞を分離し、定量 RT-PCR によって M1 タイプのマクロファージで発現が認められる遺伝子の発現量を比較した。各感染後日数における、プリオン非感染のマウス由来マイクログリアにおける mRNA 発現量を 1 とした場合の相対値を棒グラフに平均値±誤差 (n=3) で示した (左縦軸)。青：非感染マウス、赤 Chandler 株感染マウス、緑：Obihiro 株感染マウス

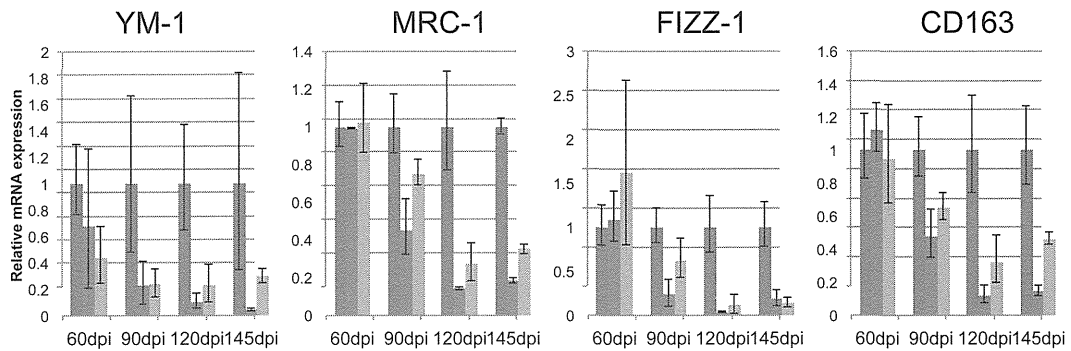


図3. プリオン感染マウス由来ミクログリアにおけるM2タイプのマクロファージ/単球で発現が認められる遺伝子発現の変化

プリオン Chandler 株、Obihiro 株およびプリオン非感染脳乳剤接種後 60 日、90 日、120 日、145 日にそれぞれ CD11b 陽性ミクログリア細胞を分離し、定量 RT-PCR によって M2 タイプのマクロファージで発現が認められる遺伝子の発現量を比較した。各感染後日数における、プリオン非感染のマウス由来ミクログリアにおける mRNA 発現量を 1 とした場合の相対値を棒グラフに平均値±誤差 (n=3) で示した (左縦軸)。青：非感染マウス、赤 Chandler 株感染マウス、緑：Obihiro 株感染マウス

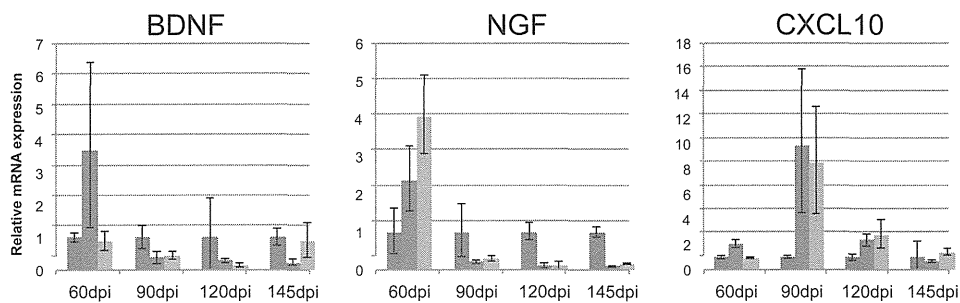


図4. プリオン感染マウス由来ミクログリアにおける神経保護・栄養因子の遺伝子発現の変化

プリオン Chandler 株、Obihiro 株およびプリオン非感染脳乳剤接種後 60 日、90 日、120 日、145 日にそれぞれ CD11b 陽性ミクログリア細胞を分離し、定量 RT-PCR によって栄養因子の遺伝子の発現量を比較した。各感染後日数における、プリオン非感染のマウス由来ミクログリアにおける mRNA 発現量を 1 とした場合の相対値を棒グラフに平均値±誤差 (n=3) で示した (左縦軸)。青：非感染マウス、赤 Chandler 株感染マウス、緑：Obihiro 株感染マウス