

201327003A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 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 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 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 25 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 25 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. 大脳皮質由来初代培養神経細胞におけるプリオン感染の解析・・・・・・・・・・・・ 8  
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. Sortilin はプリオン蛋白の分解に関与する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24  
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・・・・・・・・・・・・ 28  
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34  
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38  
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な比較解析・・・・・・・・・・・・ 42  
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・ 46  
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50  
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・・・・・・・・・・	5 6
	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・・・・・・・・・・	6 0
	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.	研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・	6 4
IV.	平成 25 年度活動状況・・・・・・・・・・	7 0

# I. 総括研究報告書

平成 25 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  
（H23-食品一般-005）

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 25 年度は、以下に述べる研究成果が得られた。

動作のデジタル解析により、L 型非定型 BSE (L-BSE) 感染牛の歩様解析では、歩行時における殿部後端と後肢球節間の距離の延長がみられた。また、L-BSE 感染牛の行動量解析により、発症時に休息状態の減少が継続することを明らかにした。以上のことから、歩様および行動量の解析により、L-BSE 感染牛の臨床症状を客観的に把握できることが示唆された。L-BSE の経口感染による人へのリスクを推定するため、サルに L-BSE 牛脳乳剤を経口投与して接種後 2 年 5 月を経過したが、発症は認められていない。霊長類の感染モデル系を確立するために、L-BSE の連続継代（脳内接種、2 継代目）をしたサルでは、潜伏期が 1.2 年まで短縮した。定型 BSE (C-BSE) (3 継代目) のサルと比較して、L-BSE 感染サルでは、認知能が低下しており、MRI 画像解析でも、顕著な脳室拡張所見が認められたことから、L-BSE および C-BSE 感染サルは、異なる病態を示すモデル系となることが明らかとなった。PMCA 法により、C-BSE 感染サルの未発症期の唾液および尿から PrP<sup>Sc</sup> が検出されることから、これらの体液が発症前診断に応用できる可能性が示唆された。

Real-time QUIC 法を用いて、組換えマウス PrP (rMoPrP) とハムスター PrP (rHaPrP) を基質とすることで、L-BSE と C-BSE の識別が可能となった。この方法は、潜在的な L-BSE の存在の調査、L-BSE から C-BSE 様の病原体が産生されるかを調べるため強力なツールとなる。

大脳皮質由来初代培養神経細胞各種プリオンが感染して PrP<sup>Sc</sup> を産生するが、シナプスマーカータンパク質の軽度な発現減少、軽度の細胞活性の低下を伴うものの、積極的な神経細胞死を生じないことから、PrP 分子の輸送・分解に関わる分子として Sortilin を同定した。PrP<sup>Sc</sup> 増殖を制御する因子群として、セクレチン受容体と phosphodiesterase 4D interacting protein を見出した。

CWD モニタリングを継続したが、これまで陽性例は見つかっていない。

## 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<sup>Sc</sup>を増幅するための QUIC 法を確立する。PMCA 法および QUIC 法の PrP<sup>Sc</sup>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<sup>Sc</sup>をシードとして、種の異なる PrP<sup>C</sup>を基質とした PMCA および QUIC 法を行い、産生された PrP<sup>Sc</sup>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<sup>Sc</sup>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<sup>Sc</sup>の分子性状を解析する。C-BSE と L-BSE の高感度検出が可能でかつ識別が可能な RT-Quic 法の確立を行う。

## 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。プリオン感染に伴う神経変性機構を解析するための *ex vivo* 実験系の確立を行う。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) L-BSE 感染牛の行動解析

昨年度脳内接種を行った、L-BSE 接種牛 (No. 5184, 6802) 歩様をモーションキャプチャーにより解析した。殿部後端と後肢球節間の距離は、臨床症状のみられない接種後 11 ヶ月で、それぞれ平均 13.9 cm であった。一方、臨床症状の発現した接種後 13、14、15 ヶ月では、それぞれ平均が 21.0、17.7、および 17.1 cm であり、発病期で大きくなる傾向が認められた。また、行動量の解析では、L-BSE 感染牛の休息スコアは、症状確認前は、対照牛 (BSE 陰性) と同様に経過していたが、症状確認後では、明らかに減少した。L-BSE 感染牛 3 頭の解剖直前の週間休息スコア  $5.0 \pm 2.6$  であったが、対照牛 4 頭の週間休息スコアは  $28.0 \pm 6.1$  であり、明らかな差が認められた。

#### 1-2) L-BSE および C-BSE 感染サルの解析

L-BSE 牛脳乳剤を経口投与して接種後 2 年 5 月を経過したが、発症は認められていない。霊長類の感染モデル系を確立するために、L-BSE の連続継代 (脳内接種、2 継代目) をしたサルでは、潜伏期が 1.2 年まで短縮したが、食物回収試験による高次脳機能解析では、定型 BSE (C-BSE) (3 継代目) のサルと比較して、L-BSE 感染サルでは、モチベーションと認知能が低下していた。MRI 画像解析では、安楽死時の神経症状は C-BSE 接種サルの方が重度であるにもかかわらず、L-BSE 接種群の方が顕著な脳室拡張所見が観察され、脳委縮が進行している可能性が示唆された。L-BSE および C-BSE 感染サルは、異なる病態を示すモデル系と

なることが明らかとなった。

診断材料として体液の有用性を確認するため、C-BSE 脳内接種継代サル の 体液 における PrP<sup>Sc</sup> の動態を解析した。C-BSE 感染サル 2 頭から、未発症期、発症初期、発症後期および解剖時に脳脊髄液、唾液、血液、尿を採取し、連続 PMCA 法により PrP<sup>Sc</sup> を増幅した。体液類はリンタンングステン酸 (PTA) 沈殿法により 10~67 倍に濃縮した後、シードとして用いた。尿中 PrP<sup>Sc</sup> は 2 頭とも発症の 2~3 ヶ月前から検出された。PrP<sup>Sc</sup> シグナル検出に必要な増幅回数および濃縮倍率から、未発症期の尿サンプルに含まれる PrP<sup>Sc</sup> 量は感染脳乳剤 (10%) を 10<sup>11</sup>~10<sup>13</sup> 倍に希釈した場合に相当すると推定された。未発症時では、1 匹のサルの血漿、異なる 1 匹のサルの脳脊髄液および唾液からも PrP<sup>Sc</sup> が確認された。この時の PrP<sup>Sc</sup> 量は尿よりも高く、10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup> 倍希釈に相当すると推定された。従って、これらの体液が発症前診断に応用できる可能性が示唆された。

## 2) BSE の起源の推定

### 2-1) 異種動物への連続継代により L-BSE プリオンの性質が vCJD 様の変化する可能性

カニクイザルへ伝播後の L-BSE プリオンを脳内接種した C57BL/6J マウスの経過観察を追跡してきた。その結果、サルへ伝播後の L-BSE プリオンは、マウスへ伝達しなかった。vCJD プリオンが近交系マウスへ潜伏期間 370 日程度で伝播可能であるのに対し、サルで増殖した L-BSE プリオンは、元の L-BSE プリオン同様の性状を示した。すなわち、L-BSE プリオンはサルへの感染を経ても vCJD プリオン様へ転換しないことを意味する。

### 2-2) L-BSE が C-BSE の起源となる可能性

L-BSE 感染牛の脳乳剤を 100°Cあるいは 112°C で加熱、150°C で油揚げ処理した。その後、ジルコニアビーズで脳組織を破壊し、C-BSE を増幅する PMCA 法を実施したが、PrP<sup>Sc</sup> は増幅されなかった。

### 2-3) BSE の起源の推定に必要な試験管内増幅法の確立

Real-time QUIC 法を用いて、組換えマウス PrP (rMoPrP) とハムスター PrP (rHaPrP) を基質とすることで、L-BSE と C-BSE の識別が可能となった。この方法は、潜在的な L-BSE の存在の調査、L-BSE から C-BSE 様の病原体が産生されるかを調べる

ため強力なツールとなる。

L-BSE 感染カニクイザルの PrP<sup>Sc</sup> の増幅条件を検討した結果、ヘパリンおよび poly A 存在下、処理温度と超音波照射条件を段階的に変更するマルチステップ PMCA により、10%感染脳乳剤を 10<sup>6</sup> 倍に希釈したサンプルまで PrP<sup>Sc</sup> が検出可能になった。

## 3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

### 3-1) 大脳皮質由来初代培養神経細胞系を用いたプリオン増殖の解析

大脳皮質由来初代培養神経細胞は、調べた全ての株 (BSE-KUS 株、22L 株、Chandler 株、および Obihiro 株) で、プリオン接種 4 日目から PrP<sup>Sc</sup> が検出され、その後増加したことから多くの株が増殖可能と考えられる。本実験で使用した大脳皮質由来神経初代培養系を安定して維持できるのは培養開始 39~46 日 (プリオン接種後 46~53 日) までであった。TUNEL 法および開裂カスパーゼ 3 (cleaved caspase-3, cCaspase-3) の検出により、プリオン増殖に伴うアポトーシスを調べたが、積極的にアポトーシスが生じているという結果は得られなかった。しかし、プリオン感染に伴い細胞の活性が低下したこと、および神経系での細胞接着因子あるいはシナプスマーカーとして知られる N-cadherin の発現が低下したことは、PrP<sup>Sc</sup> の増殖により細胞機能が障害を受けることを示唆している。

### 3-2) PrP 分子の輸送と分解に関する細胞内機構の解析

Sortilin のノックダウン、あるいは細胞内領域を欠損するミュータント Sortilin の発現により PrP<sup>C</sup> の量が増加した。このことは、Sortilin が PrP<sup>C</sup> の輸送と分解に関与することを示唆する。さらに、Sortilin で免疫沈降した複合体の中に PrP<sup>Sc</sup> が検出できたことから、PrP<sup>Sc</sup> が Sortilin と結合すると考えられた。Sortilin を siRNA でノックダウンすると、PrP<sup>Sc</sup> の量が増加し、Sortilin を過剰発現させると PrP<sup>Sc</sup> の量が低下したことから、PrP<sup>Sc</sup> も Sortilin と結合し分解される可能性を示した。

### 3-3) Glycoside-9 のプリオン増殖抑制機構の解析

PrP<sup>Sc</sup> の産生を阻害する新たなツールとして発見した Glycoside-9 について、プリオン感染細胞で

解析を進めたところ、細胞内の PrP<sup>C</sup> 量を減少させ、局在も変化し核周囲に集簇させる傾向が観察された。DNA マイクロアレイ解析をおこなったところ、インターフェロン誘導遺伝子群の mRNA 発現が Glycoside-9 処理細胞で減少する一方で (昨年報告)、発現が有意に増加する遺伝子が複数認められた。これらの PrP<sup>Sc</sup> 産生への関与を解析した結果、phosphodiesterase 4 D interacting protein (Pde4dip) が、PrP<sup>Sc</sup> の産に関与することが判明した。なお、Glycoside-9 については、早発系マウスである Tg7-263K プリオン病モデルで、脳内感染 6 週目から脳室内に 300  $\mu$ g/日の量を持続投与を行い、治療効果があるか検討したところ、効果の程度は極めて限られていたが有意な生存期間延長が観察された。

#### 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 モニタリングを継続した。北海道では、道東および道央のエゾシカ用簡易と殺場で処理された 32 頭を調べたが、全て陰性であった。

### D. 考察

#### 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) L-BSE 感染牛の行動解析

モーションキャプチャー (動作のデジタル解析) による歩様解析により、判定の難しい BSE 感染牛の歩様の变化を数値化し、客観的に变化を把握することが可能であった。非定型 BSE 感染牛では、臨床症状の発現がみられた接種後 13 ヶ月以降で殿部後端と後肢球節間の距離が対照群や臨床症状の見られない時期の定型 BSE 感染牛と比較し大きくなっていったことから、殿部後端と後肢球節間の距離が歩様の变化の客観的評価指標になる可能性が示された。

本試験で行った行動量測定で、新たに定義した「休息スコア」により、非定型 BSE 感染牛の行動量の変化を表すことができ、臨床症状を客観的に評価するための指標となり得ることが示唆された。特に休息スコアの継続的な低値を評価する週間休息スコアが 10 を下回ることは、対照牛では見られず、BSE の発症牛に限らず中枢神経の疾患により行動量の変化を示す牛を発見できる可能

性が示された。

##### 1-2) L-BSE および C-BSE 感染サルへの解析

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への経過観察と採材を継続している。2 年 5 ヶ月を経ているが、発症には至っていない。継続的な飼育観察が必要である。脳内接種サルについては、C-BSE、L-BSE とも非常に高い再現性をもって発症が認められたことから、CJD 等人プリオン病の治療研究モデルとして非常に有用と考えられる。治療研究において、その治療効果を判定する指標が必須となるが、本研究で行った、経時的サンプリングによる、末梢サンプルからの PrP<sup>Sc</sup> の検出系とともに、高次脳機能検査、脳波測定、MRI 画像診断、病理組織画像診断等を用いた評価系を確立することが可能となると思われる。

#### 2) BSE の起源の推定

##### 2-1) 異種動物への連続継代により L-BSE プリオンの性質が vCJD 様に変化する可能性

本実験において、サルで継代した C-BSE プリオンは、中間値=375 日、最短 345 日、最長 405 日で C57BL/6J マウスに伝達した。一方、サルで継代した L-BSE プリオンはマウスに伝達しなかった。この結果は、L-BSE プリオンはサルへの実験的伝播を経ても当初の特徴が (マウスへの伝播を指標として判断すると) 変化しないこと、言い換えると、L-BSE プリオンが異種動物での継代により容易に C-BSE プリオン様に変化する可能性が低いことを示唆すると考えられる。

##### 2-2) BSE の起源の推定に必要な試験管内増幅法の確立

本研究により RT-QUIC 法を C-BSE、L-BSE プリオンの高感度な検出アッセイとして確立できたと考えている。Second round まで含めた rMoPrP と rHaPrP の反応性の違いを利用すれば C-BSE と L-BSE の鑑別が RT-QUIC 法によって可能である。すなわち、仮に L-BSE が first round においてたまたま rMoPrP にのみ反応したとしても second round を行うことにより、L-BSE を C-BSE と間違えて判定することを除外できることから、感度と精度を備えた C-BSE/L-BSE であると考えられる。従って、この方法は、潜在的な L-BSE の存在の調査、L-BSE から C-BSE 様の病原体が産生されるかを調べるため強力なツールとなる。

### 3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

#### 3-1) 大脳皮質由来初代培養神経細胞系を用いたプリオン増殖の解析

プリオン感染動物の中枢神経系組織では、シナプスの崩壊と機能異常が神経細胞自律的に起こるという報告がある一方で、非自律性の神経細胞死、つまり、神経細胞以外の主要因があることを示唆する。プリオンが感染した神経細胞に、活性化したミクログリアやアストロサイトから放出されるサイトカインやケモカイン、あるいは活性化したミクログリアが放出する活性酸素種が作用して、神経変性を引き起こす可能性がある。大脳皮質由来初代培養神経細胞は、複数のプリオン株が効率良く感染したことに加え、40-45 日程度の長期間培養が可能であり、各種シナプスマーカー分子が発現すること、神経突起が著しく発達することから、これら未解明の問題にアプローチするための実験系として応用できると期待される。

#### 3-2) PrP 分子の輸送と分解に関する細胞内機構

Sortilin をノックダウンすると、PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> の量が増加した。また、PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> は Sortilin と結合した。以上の結果は、PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> とも Sortilin と結合し分解される可能性を示した。また、モノユビキチンされないミュータント Sortilin(K845R)を用いた実験から、この分解には Sortilin のモノユビキチン化が関与する可能性も示唆された。

#### 3-3) Glycoside-9 のプリオン増殖抑制機構の解析

Glycoside-9 の作用機序として、Pde4dip が PrP<sup>C</sup> および PrP<sup>Sc</sup> の産生やに関与していることが新たに明らかとなった。Pde4dip は microtubule nucleation activator としての働きが報告されており、Pde4dip 遺伝子のノックダウン実験で PrP<sup>C</sup> および PrP<sup>Sc</sup> の局在に変化が見られたことから、Pde4dip はこれらの蛋白を含有する小胞や構造物のトラフィッキングや他の細胞オルガネラとのフュージョンを制御している可能性が考えられる。より詳細な形態的解析により、細胞内での Pde4dip による PrP<sup>Sc</sup> の制御メカニズムの詳細がわかる可能性があり、それは今後の課題である。

#### 4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

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。しかし、韓国での CWD の発生事例が示すように、輸入等で CWD が侵入する可能性、および、その後我が国の鹿に CWD の感染が拡大する可能性を考慮して、継続的な対策が必要である。

### E. 結論

#### 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

- ・ モーションキャプチャーや定量的行動解析により、非定型 BSE 感染牛の臨床症状を客観的に把握できることが示唆された。
- ・ L-BSE は容易にカニクイザルには経口感染しないと考えられるが、継続して経過観察が必要である。
- ・ カニクイザルへの C-BSE 及び L-BSE 継代脳内接種により、再現性の高い早期発症系モデルを確立できた。

#### 2) BSE の起源の推定

- ・ C-BSE と L-BSE を高感度に検出し、かつ精度高く鑑別可能な RT-Quic 法を確立した。
- ・ L-BSE 感染カニクイザルの PrP<sup>Sc</sup> の増幅条件の改良に成功した。
- ・ L-BSE プリオンから C-BSE 様のプリオンが産生されるかについては、これまで、このことを示す実験結果は得られていない。

#### 3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

- ・ 大脳皮質由来初代培養神経細胞がプリオン感染の ex vivo 解析系として有用であることを示した。
- ・ PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> とも Sortilin と結合し分解される可能性を示した。
- ・ PrP<sup>Sc</sup> 増殖の制御に働く因子群として、セクレチン受容体と phosphodiesterase 4 D interacting protein を明らかにした。

#### 4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

- ・ これまで、エゾシカで CWD 陽性個体は発見

されていない。

**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. 大脳皮質由来初代培養神経細胞における プリオン感染の解析

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 藤原 愛 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

## 研究要旨

プリオン病における神経変性機構を調べるためには、神経細胞での PrP<sup>Sc</sup> の産生と神経変性を再現できる *ex vivo* の実験系が必要である。そこで本研究では、プリオン感染に伴う神経変性機構を解析できる実験系の構築を目的として、大脳皮質由来初代培養神経細胞におけるプリオンの感染を解析した。BSE-KUS 株を含む 4 種のプリオン株ともに、大脳皮質由来初代培養神経細胞で効率良く PrP<sup>Sc</sup> を産生したことから、感染成立が確認できた。プリオンに感染した神経細胞では、PSD95 や N-cadherin といった特定のシナプスタンパク質の発現が軽度に低下し、細胞活性の低下も見られたが、神経細胞の明らかな変性やアポトーシスは認められなかった。PrP<sup>Sc</sup> が産生されていたにも関わらず、神経変性が生じなかったことは、プリオン病における神経変性には、活性化したアストロサイトやミクログリアなどが産生する因子など、神経細胞以外の要因も関与する可能性を示すものと考えられた。

## A. 研究目的

プリオン感染動物の脳組織では、臨床症状を呈する前の感染後早い時期から PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が観察され、その部位に一致してアストロサイトの増生やミクログリアの活性化が認められることや、炎症性反応に関わる分子をコードする遺伝子の欠損により病態が変化することから、グリア細胞が関与する脳内の自然免疫系が、神経変性に関与していると考えられる。

一方、PrP<sup>Sc</sup> の産生により、glucose-regulated protein (Grp) 58, Grp 78, Grp 94 などの小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response, UPR) のマーカータンパク質の発現が上昇することから、プリオンが感染した細胞やプリオン病のヒトおよび動物の脳組織では、小胞体ストレスが生じていると考えられる。持続的な小胞体ストレスにより、全般的な翻訳抑制が生じ、前アポトーシス因子である caspase-12 や転写因子 CHOP/GADD153 などが活性化し、神経細胞死に至る可能性もある。

PrP<sup>Sc</sup> の産生・蓄積から神経変性に至る機構には様々な分子機構や病態機序が関与すると考えられるがその全体像は明らかではない。

そこで、大脳皮質由来初代神経培養細胞を用いて、プリオン感染により生じる神経変性機構を調べる *ex vivo* 解析系の確立を試みた。

## B. 研究方法

### 1) 大脳皮質由来初代神経培養細胞

セボフルラン浅麻酔下で妊娠マウスより胎齢 15 日目の胎仔を摘出し、氷上で断頭した後、胎仔頭部を氷冷した HBSS に入れた。Dissection Medium 中で胎仔の脳から大脳皮質領域を分離した後、0.25% Trypsin-PBS を 1 腹 (胎仔 10-16 匹) あたり 200-300  $\mu$ l 加え、37°C で 5 分間処理した。10% FBS を含む氷冷した Neurobasal Medium を Trypsin-PBS の 5 倍量加えて Trypsin を不活化した後、Neurobasal Medium で洗浄し、1 ml の Maintenance Medium 中で 20 回程度ピペッティングを行い、細胞を機械的に分散させた。100  $\mu$ m のセルストレイナー (BD Falcon) に細胞懸濁液を通した後、Maintenance Medium で適当に希釈して細胞数を計数し、Maintenance Medium で  $2 \times 10^5$  cell/ml に希釈した。希釈後の懸濁液を、用意した

8 well チャンバースライドおよび 24 well / 12 well マルチディッシュにそれぞれ 500  $\mu$ l, 1 ml および 1.5 ml /well 播種した。細胞は Maintenance Medium を用いて 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件で培養し、3-4 日に一度、培地の半量を交換した。細胞は播種後 40 日程度の維持が可能であった。

## 2) ミクロソーム画分の接種

プリオン感染マウス脳から調整したミクロソーム画分を、播種細胞  $1 \times 10^5$  個に対して PrP-res 5 ng 相当となるように接種した。プリオン非感染マウス脳由来ミクロソーム画分は、タンパク質濃度がプリオン感染ミクロソーム画分と等しくなるように接種し (複数の株を同時に接種する場合はタンパク質濃度が最大の株に合わせた)、非感染コントロールとした。

細胞分離後 7-8 日目に培地を半量除き、Maintenance Medium で上記の接種濃度となるように希釈したミクロソーム画分を、除いた培地と同じ量だけ細胞に添加することでプリオンの接種を行った。以降、3-4 日毎に、培地の半量を交換し、細胞を維持した。

## 3) WB 用試料の調整

細胞は培養上清除去後、細胞  $1 \times 10^5$  個当たり 300  $\mu$ l の lysis buffer を添加し、4°C で 30 分間静置した後、-80°C で保存した。全ての時点でサンプル回収が終了した後、4°C で自然解凍し、チューブに移して 30 秒間の超音波破碎をした後、1,500 rpm, 5 分間、4°C で遠心した。上清を回収し、その一部を DC protein assay (Bio-Rad) によるタンパク質濃度測定に用い、サンプル中で最も低いタンパク質濃度 (0.3-0.7 mg/ml) に合わせて lysis buffer で希釈した。PrP<sup>Sc</sup> 検出のため、このうち 150  $\mu$ l に、タンパク質量 : proteinase K (PK) 量 = 1 : 0.04 になるように PK を加え、37°C で 20 分間処理した。PK による消化を停止するため、0.1 M Pefabloc SC を終濃度 1 mM になるように加え、4°C で 15 分間静置した。さらに、DNase I を終濃度 50  $\mu$ g/ml になるように加え、室温で 15 分静置した。PrP<sup>Sc</sup> を沈殿させるため、5% リンタングステン酸溶液を終濃度 0.3% になるように加え、室温で 30 分間静置した。15,000 rpm で 30 分間遠心し、上清を除去した後、沈殿に SDS sample buffer を 30  $\mu$ l 加えた。その後、超音波により沈殿物を破碎し、10 分

間熱湯煮沸後、氷上で急冷した。

希釈後の残りのライセートには等量の 2  $\times$  SDS sample buffer を加え、10 分間熱湯煮沸後、氷上で急冷し、シナプスマーカー等のタンパク質の検出用試料とした。WB 用試料は使用まで -30°C で保存した。

## 4) IFA

mAb132 を用いる PrP<sup>Sc</sup> 特異的染色により PrP<sup>Sc</sup> を検出した<sup>1)</sup>。

## 4)

### (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 2013-1-55, 56)。また、動物実験は北海道大学大学の実験動物委員会で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) 大脳皮質由来初代培養神経細胞へのプリオンの感染

まず、大脳皮質由来初代培養神経細胞にプリオンが感染するか否かを調べるため、各種プリオン株を接種し、プリオンの増殖を調べた。BSE-KUS 株、22L 株、Chandler 株、および Obihiro 株の全ての株で、プリオン接種 4 日目から PrP-res が検出され、その後増加した (図 1)。

WB で確認された PrP-res 量の増加が、神経細胞での PrP<sup>Sc</sup> の増殖を反映しているかどうかを調べるため、mAb132 を用いた PrP<sup>Sc</sup> 特異的染色と成熟神経細胞マーカーである microtubule associated protein 2 (MAP2) の蛍光二重染色を行い、IFA により解析した (図 2)。IFA でも、22L 株、Chandler 株、BSE-KUS 株および Obihiro 株の全てにおいて、大脳皮質由来初代培養神経細胞で PrP<sup>Sc</sup> が増加することが確認された。22L 株では、接種後 4 日目から弱いシグナルではあるが mAb 132 で検出される PrP<sup>Sc</sup> が認められた。PrP<sup>Sc</sup> は接種後 11 日目には明らかに増加し、その後、観察期間中に増加する傾向が確認できた。Chandler 株では、接種後 11 日目に顆粒状に染色される PrP<sup>Sc</sup> が認められ、その後増加した。KUS 株と Obihiro 株では、接種後



4日目から PrP<sup>Sc</sup> のシグナルが検出され、その後、観察期間中増加する傾向が認められた。いずれの株でも、接種後4日目では、細胞がないと思われるところにも PrP<sup>Sc</sup> が検出される場合があることから、接種物由来の PrP<sup>Sc</sup> である可能性は完全には否定できない。しかし、接種後11日目には、mAb132で染色される PrP<sup>Sc</sup> が明らかに増加することから、接種後11日目以降に検出される PrP<sup>Sc</sup> のほとんどは、初代培養神経細胞でプリオンが増殖したことを反映していると考えられる。

本実験で使用した大脳皮質由来神経初代培養系を安定して維持できるのは培養開始39~46日(プリオン接種後46~53日)までであった。

## 2) アポトーシスの誘導

大脳皮質由来初代培養神経細胞において、プリオン感染によるアポトーシスが起こるかどうかを調べるため、TUNEL法および開裂カスパーゼ3(cleaved caspase-3, cCaspase-3)の検出を実施した。

接種後25および32日目では、TUNEL陽性細胞は、非感染細胞(25dpiで66%、32dpiで71%)と22L株感染細胞(25dpiで57%、32dpiで69%)とで有意な差は認められなかった。また、アポトーシスの前期に発現するcCaspase-3の検出を行った。接種後25および32日目では、非感染細胞(25dpiで51%、32dpiで69%)と感染細胞(25dpiで22L株:53%、Chandler株:50%、KUS株:50%、32dpiでそれぞれ68%、69%、71%)とで有意差は認められなかった。また、神経細胞での PrP<sup>Sc</sup> 産生とcCaspase-3発現との関係を調べるため、MAP2、cCaspase-3、PrP<sup>Sc</sup>の三重染色を行ったが、PrP<sup>Sc</sup>が明瞭に陽性となるMAP2陽性神経細胞で、cCaspase-3陽性となるものは、使用したプリオン株全てにおいて確認できなかった(結果は示さず)。

## 3) 細胞活性の変化とシナプスマーカーの発現

神経細胞の活性の変化を、細胞の脱水素酵素の活性を調べるWST試験により調べた(図3)。接種後18日目までは非感染細胞と感染細胞で差は認められなかったが、接種後25日目に、全ての株で細胞の活性が低下した。その後は、32~39日目にかけて、感染細胞で活性が上昇する傾向がみられた。

前シナプスマーカーである Synaptophysin は、

培養直後で発現が低く、その後は培養日数に従って経時的に増加した(結果は示さず)。全ての株で、非感染細胞と感染細胞に発現量の差は認められなかった。神経系での細胞接着因子あるいはシナプスマーカーとしても知られるN-cadherinは、プリオン接種前から安定して発現していたが、22L株およびChandler株を接種した細胞では、接種後32、39日目に非感染細胞よりも発現が有意に低下した(図4)。

## D. 考察

大脳皮質由来の神経初代培養系にプリオンを接種したところ、22L株、Chandler株、KUS株およびObihiro株で PrP<sup>Sc</sup> の経時的な増加が確認できた。本培養系にはMAP2陽性の神経細胞が豊富に含まれ、また、プリオン接種後25日目以降では8割近くのMAP2陽性神経細胞が感染しており、感染効率が高いことが判った。さらに、N2a細胞では増殖しないKUS株やObihiro株が、本培養系の神経細胞に感染した。大脳皮質由来初代培養神経細胞は、複数のプリオン株が効率良く感染したことに加え、40-45日程度の長期間培養が可能であり、各種シナプスマーカー分子が発現すること、神経突起が著しく発達することから、プリオン感染に伴う神経細胞の変化を解析する実験系として応用できると考えられた。

大脳皮質由来初代培養神経細胞では、PrP<sup>Sc</sup> が産生され、経時的に増加していたにも関わらず、アポトーシスや顕著な神経細胞死は起こっていない。プリオン感染動物の脳では、PrP<sup>Sc</sup> の増加がプラトーに達した後に、病態が神経毒性を発揮するフェーズへ移行し、臨床症状が発現するという報告がある。また、小脳由来の初代培養神経細胞では、MAP2陽性細胞の減少やアポトーシスの増加が起こり始めるのはプリオン接種から2~3週間前後であり、この時期は PrP<sup>Sc</sup> の増加がプラトーに達する時期と一致するという報告がある<sup>2)</sup>。本実験では、細胞分離後39-46日間(接種後32-39日間)の培養を行っており、この期間内に、PrP-res量、PrP<sup>Sc</sup>染色像のシグナル強度、神経細胞内のPrP<sup>Sc</sup>顆粒数はプラトーに達し、PrP<sup>Sc</sup>は神経細胞で十分に増加していると考えられた。よって、積極的なアポトーシスが観察されなかったのは、培養期間が十分でなかったためとは考えにくい。

プリオン感染動物の中樞神経系組織では、シナプスの崩壊と機能異常が神経細胞自律的に起こるといふ報告がある<sup>3,4)</sup>。今回の実験でも、N-cadherin といった特定のシナプスタンパク質の発現の減少が認められた。接種後 25 日から 32 日にかけて細胞の活性が低下したこともこの考えを支持する。一方、PrP<sup>Sc</sup> が十分に産生されていたにもかかわらず、顕著な神経変性が生じなかったことは、プリオンの感染に伴う神経変性に、非自律性の神経細胞死、つまり、神経細胞以外の主要因があることを示唆する。プリオン感染動物の脳組織では、PrP<sup>Sc</sup> の産生に少し遅れて、PrP<sup>Sc</sup> が産生される場所で、アストロサイトおよびミクログリアが活性化し、病態の進行にともない、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現が増加する。自然免疫に関与する分子、サイトカインあるいはサイトカイン受容体およびケモカイン受容体の欠損、あるいは阻害剤によりプリオン病の病態進行が影響を受けることから、グリア細胞が病態機序に深く関わると考えられる。従って、プリオンが感染した神経細胞に、活性化したミクログリアやアストロサイトから放出されるサイトカインやケモカイン、あるいは活性化したミクログリアが放出する活性酸素種が作用して、神経変性を引き起こす可能性がある。

本研究では、大脳皮質由来神経初代培養系がプリオン感染の ex vivo 解析系として有用であることを示した。今後、小胞体ストレスなどのより詳細な解析を行うとともに、活性化アストロサイトやミクログリアの影響を解析することで、プリオン病における神経変性機構の一端を解明できると考えられる。

## E. 結論

BSE-KUS 株を含む 4 種のプリオン株ともに、大脳皮質由来初代培養神経細胞で効率良く PrP<sup>Sc</sup> を産生したことから、大脳皮質由来初代培養神経細胞がプリオン感染の ex vivo 解析系として有用であることを示した。プリオンに感染した神経細胞では、特定のシナプスタンパク質の発現が軽度低下し、細胞活性の低下も見られたが、神経細胞の明らかな変性やアポトーシスは認められなかった。PrP<sup>Sc</sup> が産生されていたにもかかわらず、顕著な神経変性は生じなかった。

## [参考文献]

- 1) Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol*, 93: 668-680, 2012
- 2) Sandberg, M. K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Clarke, A. R., and Collinge, J. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature*, 470: 540-542, 2011
- 3) Perry, V. H. and O'Connor, V. The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN. Neuro*, 2: e00047, 2010
- 4) Sisková, Z., Page, A., O'Connor, V., and Perry, V. H. Degenerating synaptic boutons in prion disease: microglia activation without synaptic stripping. *Am J Pathol*, 175: 1610-1621, 2009

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohsawa N, Song CH, Suzuki A, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol Immunol* 57: 288-297, 2013.
- 2) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.
- 3) Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrPSc during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology* 450-451C: 324-335, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Horiuchi, M., Kabuki, H., and Hasebe, R. Analysis of microglial activation state in brains of

prion-infected mice. Prion 2013, Banff, Canada, May 26-29, 2013.

- 2) Hasebe, R., Suzuki A., Yamasaki, T., and Horiuchi, M. Reaction of complement factors on scrapie-infected primary-cultured neurons temporarily increases permeability of plasma membrane. Prion 2013, Banff, Canada, May 26-29, 2013.
- 3) Kabuki, H., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Analysis of microglial activation state in brains of prion-infected mice. Asia Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, Japan, July 21-22, 2013.
- 4) Sakai, K., Hasebe, R., Takahashi, Y., Song, C.-H.,

Suzuki, A., Yamasaki, T., Horiuchi, M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. Expanding Prion Horizon 2013, Fort Collins, USA, Oct. 16-18, 2012.

#### 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

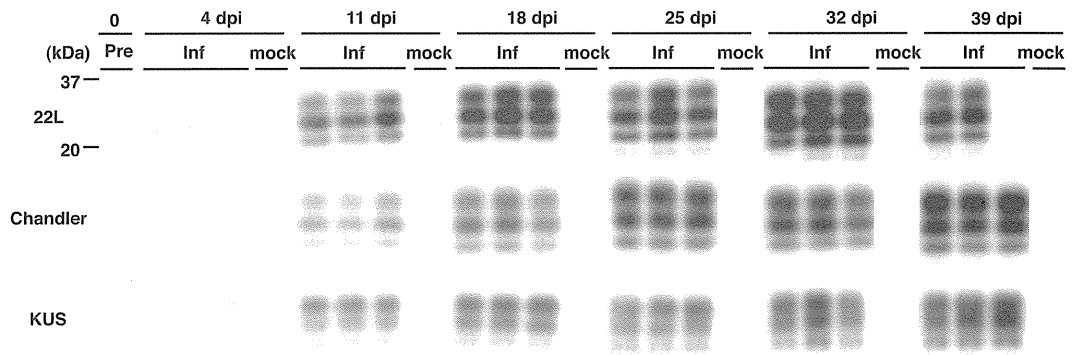


図 1. 大脳皮質由来神経初代培養系における PrP-res 量の経時的変化

22L 株、Chandler 株および KUS 株由来マイクロソームを接種後、4, 11, 18, 25, 32, 39 日目に PrP-res を WB により検出した。Pre は接種前、Inf はプリオン感染マウス由来マイクロソーム接種、Mock はプリオン非感染マウス由来マイクロソームを接種した大脳皮質由来神経初代培養を示す。

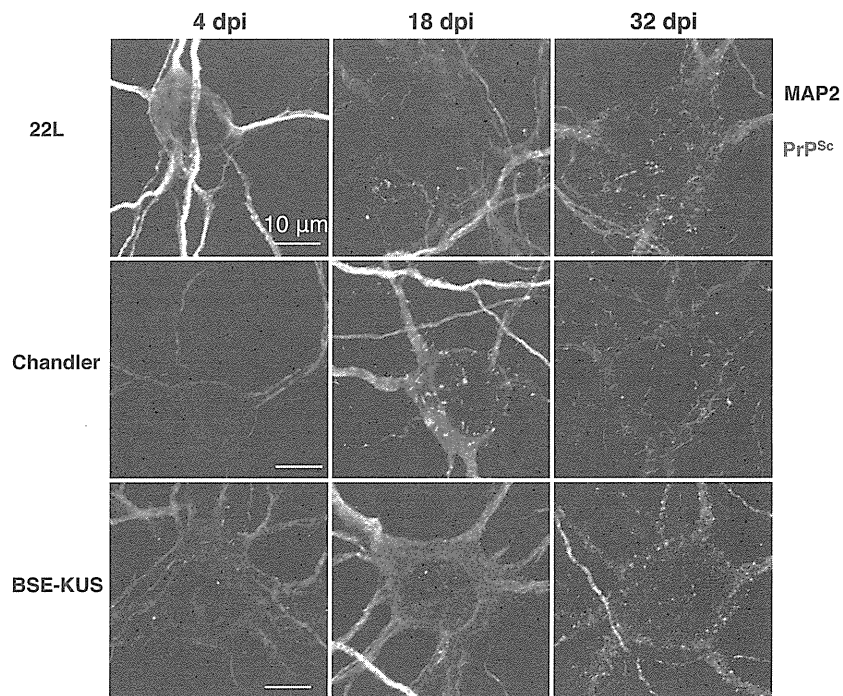


図 2. 大脳皮質由来神経初代培養における PrP<sup>Sc</sup> の検出

プリオン 22L 株、Chandler 株、BSE-KUS 株由来マイクロソーム接種後、4, 18, 32 日目に PrP<sup>Sc</sup> (緑) と MAP2 (白) の二重染色を行った。核は DAPI で染色した (青)。各株とも、PrP<sup>Sc</sup>、MAP2、および DAPI の重ね合わせ像を図に示し、強拡大像を示す (bar, 10 μm)。