

201327003B

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 23～25 年度 総合研究報告書

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 23～25 年度 総合研究報告書

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)

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
石黒 直隆	岐阜大学応用生物科学部・食品環境衛生学研究室	教授
北本 哲之	東北大学・大学院医学系研究・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





# I. 総合研究報告書

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）

総合研究報告書

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

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。

L 型非定型 BSE (L-BSE) の啓発活動のために臨床症状を詳細に記録した。動作のデジタル解析により、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、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から、歩様および行動量の解析により、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 (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 および定型 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、定型 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。

L-BSE 感染牛の脳乳剤を種々の条件で加熱処理した試料から、定型 BSE 様 PrP<sup>Sc</sup> の増幅を試みたが、PrP<sup>Sc</sup> は増幅されなかった。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 と定型 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 から定型 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、積極的な神経細胞死を生じないことから、活性化ミクログリアやアストロサイトの神経細胞死の関与が示唆された。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ることを見出し、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、新たに、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。BSE 管理措置変更の理解度を調査するために、消費者団体と食肉処理関連業者を対象にアンケート調査を実施した。

## 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）

石黒 直隆（岐阜大学応用生物科学部・獣医学課程・教授）（平成 23 年度）

北本 哲之（東北大学大学院医学系研究・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徴の解明、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

L 型非定型 BSE (L-BSE) 接種牛の臨床症状の詳細

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、L-BSE の臨床症状の客観的評価基準の作成を進めた。L-BSE 実験接種牛の病変分布を、定型 BSE 感染牛と比較解析した。また、啓蒙活動用に臨床症状の詳細な映像を記録した。

L-BSE の食を介する人への感染リスクを推定するために、カニクイザルへの経口感染実験を実施し、経時的に血液、尿、髄液を採取した。また、L-BSE および定型 BSE 感染サルモデルのため、感染サルの脳を脳内接種によりサルに継代した。L-BSE 感染牛および定型 BSE 脳乳剤を接種したカニクイザルの、神経病理組織学的解析、脳波測定、高次脳機能評価試験を行うとともに、人道的エンドポイントに至ったサルは安楽殺し、MRI 所見を解析した。PMCA 法により BSE 感染サル組織および体液におけるプリオンの時間的・空間的分布を解析した。

定型および L-BSE を末梢投与したハムスターにおける病態解析を行い、BSE 感染モデルとしての有用性を評価した。

L-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>検出の定量的解釈法を検討した。

## 2) BSE の起源の推定

定型 BSE および L-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 RT-QIUC 法を行い、L-BSE 高感度増幅法の確立と定型 BSE/L-BSE の識別法を検討した。

定型および L-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した。

L-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>の分子性状を解析した。

## 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析した。

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* 実験系として、神経幹細胞

(Neurosphere) および大脳皮質由来初代神経培養系におけるプリオンの増殖とそれに伴う変化を解析した。

抗プリオン活性を有する新規化合物グリコシド 9 のて作用機序を明らかにして予防・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した。また、プリオンの増殖が細胞内膜輸送経路に及ぼす影響について解析した。

## 4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

北海道および本州で鹿簡易と殺場と連携して CWD モニタリングと PrP 遺伝子解析を実施した。カナダ、アメリカ、ノルウェイの研究機関から 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した。文献情報等を含めた非定型 BSE の情報整理を実施した。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。

### (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ール等に従い、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、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。

脳内接種による L-BSE 感染牛を作出し、臨床症状の記録、行動量測定、聴性脳幹誘発電位 (BAEP) 測定を行い、臨床症状の客観的評価に資するデータを作成するため、非定型 BSE (L 型: BSE/JP24 Serial) (n=2) または定型 BSE (BSE/JP05) (n=1) の 10%BSE 感染脳乳剤をそれぞれ 1ml 脳内接種し BSE 感染牛を作出した。

L-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



若干の後肢の蹠痕が見られたが、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無かった。また、L-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<sup>Sc</sup>の蓄積を確認した。

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13.9cm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17.1cm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および定型BSE感染サルの解析。

ヒトのvCJDに関するリスクの評価とvCJD感染サルモデルを確立する目的で、定型BSE(BSE JP/8 和歌山)脳内接種を行い、継時的なサンプリングとともに、発症サルについて脳MRI画像、プリオン蛋白及び病理組織について解析を行った。カニクイザルへの定型BSE継代接種では、潜伏期は短縮され、再現性の高いvCJD早期発症系モデルが確立できた。

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<sup>Sc</sup>が検出された。尿中には $10^{12} \sim 10^{11}$ に相当するPrP<sup>Sc</sup>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。

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(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定型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および定型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。L-BSE接種カニクイザルの病理学的所見は、孤発性CJD(sCJD)に類似した特徴が認められたことから、L-BSEの人へのリスクの解析に加えて、sCJDの発症機序解明、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になると考えられた。

診断材料として体液の有用性を確認するため、定型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。定型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。体液類はリンタングステン酸(PTA)沈殿法により $10 \sim 67$ 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 $10^{11} \sim 10^{13}$ 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、 $10^{10} \sim 10^{11}$ 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 が定型 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、定型 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。

定型 BSE の PrP<sup>Sc</sup> を増幅する連続 PMCA 法では、L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> を増幅できないことから、定型 BSE の PrP<sup>Sc</sup> の選択的増幅法として利用できることが判明した。一方、RT-QUIC 法では、組み換えヒト PrP (rHuPrP) を用いた場合、L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> のみが増幅可能であった。従って、PMCA 法と RT-QUIC 法を組み合わせることで、定型 BSE と L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> を区別して増幅可能となる。

さらに RT-QUIC 法の増幅条件を検討した結果、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 と定型 BSE の識別が可能となった。この方法は、高感度に潜在的な L-BSE の存在の調査、L-BSE から定型 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。

2-4) PrP 糖鎖型の解析。

L-BSE では、ウェスタンブロット分析により検出される PrP<sup>Sc</sup> 分子うち 1 糖鎖型の構成比が高いという蛋白質化学的な特徴をもつことから、L-BSE プリオンの 1 糖鎖型 PrP<sup>Sc</sup> の糖鎖修飾について解析を進めた。定型 BSE (JP6) でも L-BSE (JP24) でも、1 糖鎖型 PrP<sup>Sc</sup> は主に Asn208 に糖鎖修飾が起きていることを示唆するデータが得られ、両者の差は認められなかった。

3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明。

3-1) プリオンの感染・増殖により神経細胞の変性を再現できる培養細胞実験系の構築。

プリオンの感染・増殖により神経細胞の変性を

再現できる培養細胞実験系の構築を目的として、分化 Neurospheres に各種プリオン株を接種して、感染動態を調べた。用いたプリオン株のうち、BSE 由来の BSEKUS 株は、分化 Neurospheres の神経細胞に感染し易い傾向があること、また、BSEKUS 株が感染した神経細胞では前シナプスマーカーである synaptophysin の発現が低下してたことから、BSEKUS 株と分化 Neurospheres の組み合わせはプリオンの増殖により生じる神経細胞の変性機構の解析に応用できる可能性があることが示唆された。

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。

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 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> の産に關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。

3-4) プリオン病の病態に關与する分子としての peripherin の同定。

プリオン感染に感受性・非感受性培養細胞の比較検討から同定された peripherin のプリオン病病態への關与を解析するため、CAG プロモーターにより発現される peripherin 強発現トランスジェニックマウスを作製し、プリオン感染と病態推移に与える影響を検討した。peripherin トランスジェニックマウスではプリオン病態の進行が促進することが明らかとなった。

3-5) プリオン感染に伴うミクログリアの活性化状態の解析。

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- $\alpha$ 、IL-12p40 および IL-1 $\beta$  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。

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 40 頭を調べたが、CWD は陰性であった。また、計 6 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 <sup>20</sup>Asp<sup>95</sup>Gln<sup>96</sup>Gly<sup>100</sup>Ser<sup>116</sup>Ala<sup>132</sup>M<sup>225</sup>Ser<sup>226</sup>Gln であり、アミノ酸多型は認められなかった。エゾシカ CWD 感受性は不明であるが、エゾシカは他の鹿科動物で CWD 感受性であると報告されているアミノ酸多型を有していることが示唆された。

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。

## 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。

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、L-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。しかし、詳細な経過観察により、啓蒙活動用に、歩様異常や転倒などの L-BSE の臨床症状を記録することができた。L-BSE モーションキャプチャーによる歩様解析により、判定の難しい BSE 感染牛の歩様の変化を数値化し、客観的に変化を把握することが可能であった。L-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変化の客観的評価指標になる可能性が示された。

また、新たに定義した「休息スコア」により、L-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。

#### 1-2) L-BSE および定型 BSE 感染サルの解析。

L-BSE を経口投与したサル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、発症には至っておらず継続的な飼育観察と採材が必要である。ネズミキツネザルでは L-BSE の経口感染が成立することが報告されており、より高等な霊長類での経口感染成立の可否を慎重に判断する必要がある。L-BSE 感染サル組織から PrP<sup>Sc</sup> を増幅する PMCA 法の感度が向上したことから、経時的に採材した体液等からの PrP<sup>Sc</sup> の検出することで、感染成立を早期に検出できる可能性がある。

脳内接種では、L-BSE がカニクイザルに再現良く感染することから、L-BSE のヒトへのリスクを解析する実験系として有用であると同時に、その神経病態は sCJD に似ることから、sCJD の霊長類モデルとして有用と考えられる。脳内接種サルについては、定型 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。

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<sup>Sc</sup> 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。

#### 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。

本実験において、サルで継代した定型 BSE プリオンは、中間値=375 日、最短 345 日、最長 405 日で C57BL6/J 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定型 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。

L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> が、定型 BSE の PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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。この性質を往々して、L-BSE 感染牛の脳乳剤を 100℃あるいは 112℃で加熱、150℃で油揚げ処理した試料から、定型 BSE 様 PrP<sup>Sc</sup> の増幅を試みたが、PrP<sup>Sc</sup> は増幅されなかった。

さらに RT-QUIC の条件検討を進め、rMoPrP と rHaPrP を使用することで、定型 BSE、L-BSE プリオンを区別する高感度な検出アッセイとして確立できた。Second round まで含めた rMoPrP と rHaPrP の反応性の違いを利用すれば定型 BSE と L-BSE の高精度な区別が可能である。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 を定型 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定型 BSE/L-BSE 識別法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 から定型 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) プリオンの感染・増殖により神経細胞の変性を再現できる培養細胞実験系の構築。

BSE 由来プリオン株 KUS が他のプリオン株と比較して、培養細胞系で初代神経細胞に感染し易く、感染した神経細胞で前シナプスマーカーの発現が低下したが、前シナプスマーカーの発現低下はプリオン感染動物の中枢神経系で認められることから、この実験系がプリオン感染による神経変性機構を解析する ex vivo の実験系となることが期待される。



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の解析。

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。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とプリオン増殖における peripherin の関与。

Glycoside-9 の作用の解析の過程で、インターフェロニングナル伝達系とプリオン増殖との関連を見出した。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ク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。

Peripherin トランスジェニックマウスを用いた感染実験から、peripherin はプリオン病の病態の推移を促進すると考えられたが、培養細胞を用いた研究では peripherin はプリオンの細胞内への取り

込みを増強することから、その機序として、プリオンの効率的な取り込みが関与すると考えられた。このように、プリオンの増殖に関わる新規因子が複数同定できた。

### 3-4) プリオン感染に伴うミクログリアの活性化状態の解析。

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。

### 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。

### 5) BSE 管理措置変更に伴う意識調査。

平成 26 年 3 月に消費者団体および食肉処理業者の、BSE 管理措置の変更の理解度等を調べる目的でアンケート調査を実施している。本報告書印刷段階でアンケート結果の集計が終了していないため、アンケート結果は別冊として添付予定である。

## 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、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。また、啓発活動用の臨床症状の記録に成功した。
  - ・ L-BSE はカニクイザルに高い再現性で感染が成立し、L-BSE の人へのリスクの解析に加えて、sCJD の有用なモデル系になると考えられた。
  - ・ 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

えある。

- ・ 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) BSE の起源の推定。

- ・ 定型 BSE と L-BSE を高感度に検出し、かつ精度良く鑑別可能な 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 プリオンから定型 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。

- ・ Neurosphere と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。
- ・ 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。
- ・ プリオンの増殖に関与する因子として、Glycoside-9 と peripherin を同定した。
- ・ 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。
- ・ 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。

## 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、エゾシカおよびニホンジカで 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

II. 研究成果に刊行物一覧および代表的な論文を選択して掲載した。

### 2. 学会発表

件数が多いため、割愛した。各年度の総括・分担研究報告書に記載した。

## 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. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堀内基広	プリオン病		最新医学	最新医学社	大阪	2011	2713-2720
堀内基広	プリオンとプリオン病	見上彪監修	獣医微生物学 (第3版)	文永堂出版	東京	2011	280-285
新竜一郎、佐藤克也	プリオン病の髄液診断の可能性	鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆	Annual Review 神経	中外医学社	東京	2011	121-129
新竜一郎、西田教行	プリオン病診断法の開発	千海俊幸	最新医学	最新医学社	大阪	2012	2572-2576
坂口末廣	44 章スローウイルスとプリオン	吉開泰信 / 西山幸廣	レビンソン微生物学・免疫学 [原書 11 版]	丸善出版	東京	2012	321-325
佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行	髄液 14-3-3 蛋白とタウ蛋白増加の鑑別診断	青木滋	Clinical Neuroscience	中外医学社	東京	2013	850-851
佐藤克也, 新竜一郎, 西田教行	髄液検査のポイントと鑑別診断	青木滋	Clinical Neuroscience	中外医学社	東京	2013	1080-1082
新竜一郎	QUIC 法と他の高感度異常型プリオン蛋白検出法	青木滋	Clinical Neuroscience	中外医学社	東京	2013	1083-1085
Uchiyama K, Sakaguchi S.	Immunological Strategies for the Prevention and Treatment of Prion Diseases.	Sakudo A, Onodera T	Prions: Current Progress in Advanced Research.	Caister Academic Press	UK	2013	75-92
Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S	Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from Thermococcus kodakarensis KOD1		Applied microbiology and biotechnology	Springer International	Germany	2013	Published online (2013 Jul 24)
Takashi Yokoyama	Bovine spongiform encephalopathy and scrapie	Akikazu Sakudo and Takashi Onodera	Prions: Current Progress in Advanced Research	Casiter Academic Press,	Norfolk, UK	2013	93-110



雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Song, C.-H., Honmou, O., Furuoka, H. and Horiuchi, M.	Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions.	J. Virol.	85:	11069-11078	2011
Tamao, H., Inoshima, Y. and Ishiguro, N.	Distribution of immune cells and expression of interleukin receptors in ileal Peyer's patches of calves.	Cell Tissue Res.	346	245-254	2011
Murakami, M., Inoshima, Y., Watanabe, K., Kobayashi, Y., Matsui, T., Kurazono, H. and Ishiguro, N.	Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits.	Amyloid	18	112-118	2011
※Atarashi, R., Sano, K., Satoh, K. and Nishida, N.	Real-time quaking-induced conversion: A highly sensitive assay for prion detection.	Prion	5(3)	150-153	2011
Matsui, Y., Satoh, K., Miyazaki, T., Shirabe, S., Atarashi, R., Mutsukura, K., Satoh, A., Kataoka, Y. and Nishida, N.	High sensitivity of an ELISA kit for detection of the gamma-isoform of 14-3-3 proteins: usefulness in laboratory diagnosis of human prion disease.	BMC Neurol.	11	120	2011
Fujita, K., Harada, M., Sasaki, M., Yuasa, T., Sakai, K., Hamaguchi, T., Sanjo, N., Shiga, Y., Satoh, K., Atarashi, R., Shirabe, S., Nagata, K., Maeda, T., Murayama, S., Izumi, Y., Kaji, R., Yamada, M. and Mizusawa, H.	Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study.	BMJ Open	2	e000649	2012
Kobayashi, A., Mizukoshi, K., Iwasaki, Y., Miyata, H., Yoshida, Y. and Kitamoto, T.	Co-occurrence of types 1 and 2 PrPres in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1	Am. J. Pathol.	178	1309-1315	2011
Takeuchi, A., Komiya, M., Kitamoto, T. and Morita, M.	Deduction of the evaluation limit and termination timing of multi-round protein misfolding cyclic amplification from a titration curve.	Microbiol. Immunol.	55 (7)	502-9	2011

Yokoyama, T., Takeuchi, A., Yamamoto, M., Kitamoto, T., Ironside, JW. and Morita, M.	Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease.	Neurosci. Lett.	498 (2)	119-23	2011
Ishibashi, D., Yamanaka, H., Mori, T., Yamaguchi, N., Yamaguchi, Y., Nishida, N. and Sakaguchi, S.	Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice.	Vaccine	29	9321-9328	2011
Fujita, K., Yamaguchi, Y., Mori, T., Muramatsu, N., Miyamoto, T., Yano, M., Miyata, H., Ootsuyama, A., Sawada, M., Matsuda, H., Kaji, R. and Sakaguchi, S.	Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions.	Cell Mol. Neurobiol.	31	999-1008	2011
Unno, M., Shinohara, M., Takayama, K., Tanaka, H., Teruya, K., Doh-ura, K., Sakai, R., Sasaki, M. and Ikeda-Saito, M.	Binding and Selectivity of the Marine Toxin Neodysiherbaine A and Its Synthetic Analogues to GluK1 and GluK2 Kainate Receptors.	J. Mol. Biol.	413 (3)	667-683	2011
Nguyen, T.,, Sakasegawa, Y., Doh-ura, K. and Go, ML.	Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position.	Eur. J. Med. Chem.	46 (7)	2917-2929	2011
Ono, F., Tase, N., Kurosawa, A., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Terao, K. and Sata, T.	Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate.	Jpn. J. Infect. Dis.	64(1)	81-84	2011
Ono, F., Terao, K., Tase, N., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Kurosawa, A., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, K., Yamakawa, Y. and Sata, T.	Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to cynomolgus macaques, a non-human primate.	Jpn. J. Infect. Dis.	64(1)	50-54	2011
Fukuda, S., Okada, H., Arai, S., Yokoyama, T.	Neuropathological Changes in Auditory Brainstem Nuclei	J.Comp.Pathol.	145	302-307	2011

and Mohri, S.	in Cattle with Experimentally Induced Bovine Spongiform Encephalopathy.				
Yoshioka, M., Imamura, M., Okada, H., Shimozaki, N., Murayama, Y., Yokoyama, T. and Mohri, S.	Sc237 hamster PrPSc and Sc237-derived mouse PrPSc generated by interspecies in vitro amplification exhibit distinct pathological and biochemical properties in tga20 transgenic mice.	Microbiol. Immunol.	55	331-340	2011
Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Murayama, Y., Mohri, S. and Yokoyama, T.	Detection of disease-associated prion protein in the posterior portion of the small intestine involving the continuous peyer's patch in cattle orally infected with bovine spongiform encephalopathy agent.	Transbound. Emerg. Dis.	58	333-343	2011
Shu, Y., Masujin, K., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Mohri, S. and Yokoyama, T.	Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies.	Prion	5	103-108	2011
Honda, H., Sasaki, K., Minaki, H., Masui, K., Suzuki, SO., Doh-ura, K. and Iwaki T.	Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion.	Neuropathology	32(2)	124-132	2012
※Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R. and Horiuchi, M.	Characterization of intracellular localization of PrPSc 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
※Masujin, K., Miwa, R., Okada, H., Mohri, S. and Yokoyama, T.	Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions.	Prion	6	1-5	2012
※Fukuda, S., Onoe, S., Nikaido, S., Fujii, K., Kageyama, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Yoshioka, M., Murayama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. and Okada H.	Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation.	Jpn. J. Infect. Dis.	65	37-44.	2012
Hasebe, R., Raymond, G. J., Horiuchi, M., and	Reaction of complement factors varies with prion	Virology	423,	205-213	2012

Caughey, B.	strains in vitro and in vivo.				
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 beed and beef offal to Japan.	J. Vet. Med. Sci.	74(8)	959-968	2012
Nakato G., Hase K., Suzuki M., Kimura M., Ato M., Hanazato M., Tobiume M, Horiuchi M., Atarashi R., Nishida N., Watarai M., Imaoka K. and Ohno H.	Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor.	J. Immunol.	189(4)	1540-15444	2012
Ishibashi D., Atarashi R. and Nishida N.	Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection.	Prion.	6(5)	443-446	2012
Ishibashi D., Atarashi R., Fuse T., Nakagaki T., Yamaguchi N., Satoh K., Honda K. and Nishida N.	Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection.	J. Virol.	86(9)	4947-4955	2012
Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T	Enhanced antigen retrieval of amyloid $\beta$ immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid $\beta$ pathology in Alzheimer disease and its mouse model	J. Histochem. Cytochem.	60	761-769	2012
Takeda N, Yokota O, Terada S, Haraguchi T, Nobukuni K, Mizuki R, Honda H, Yoshida H, Kishimoto Y, Oshima E, Ishizu H, Satoh K, Kitamoto T, Ihara Y, Uchitomi Y	Creutzfeldt-Jakob disease with the M232R mutation in the prion protein gene in two cases showing different disease courses: A clinicopathological study	J. Neurol. Sci.	312	108-116	2012
Yamaguchi Y, Miyata H, Uchiyama K, Ootsuyama A, Inubushi S, Mori T, Muramatsu N, Katamine S, Sakaguchi S.	Biological and biochemical characterization of mice expressing prion protein devoid of the octapeptide repeat region after infection with prions.	PLoS ONE	7(8)	e43540	2012
Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T,	Direct evidence of generation and accumulation of $\beta$ -sheet-rich prion protein in ScN2a cells de novo illuminated by human IgG1 antibody recognizing $\beta$ -form	J. Biol. Chem.	287 (17)	14023-14039	2012