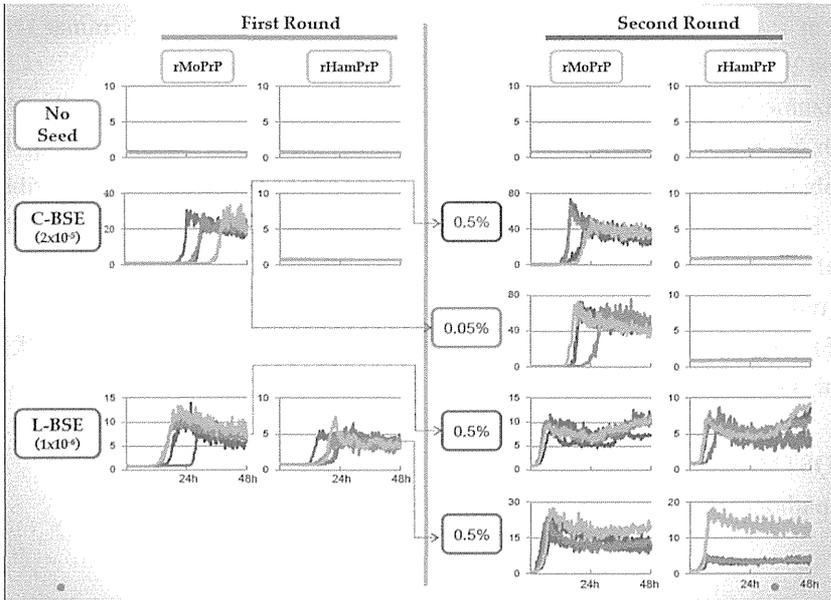
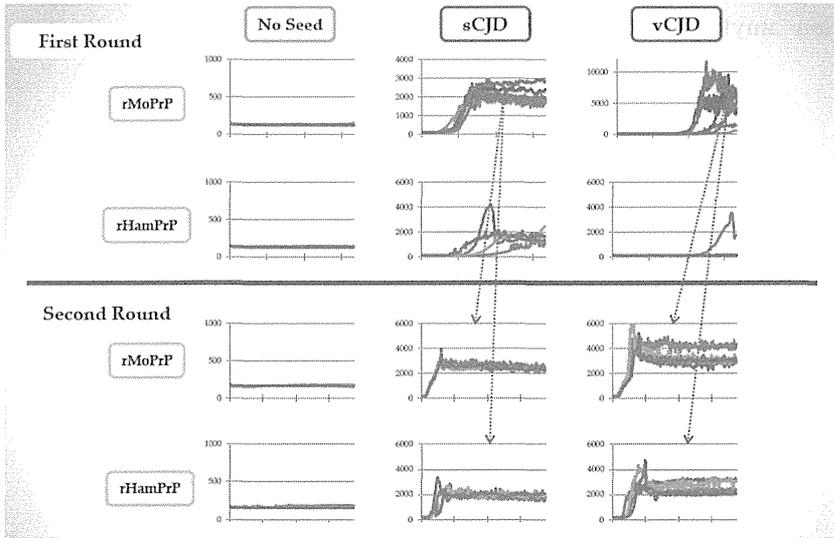


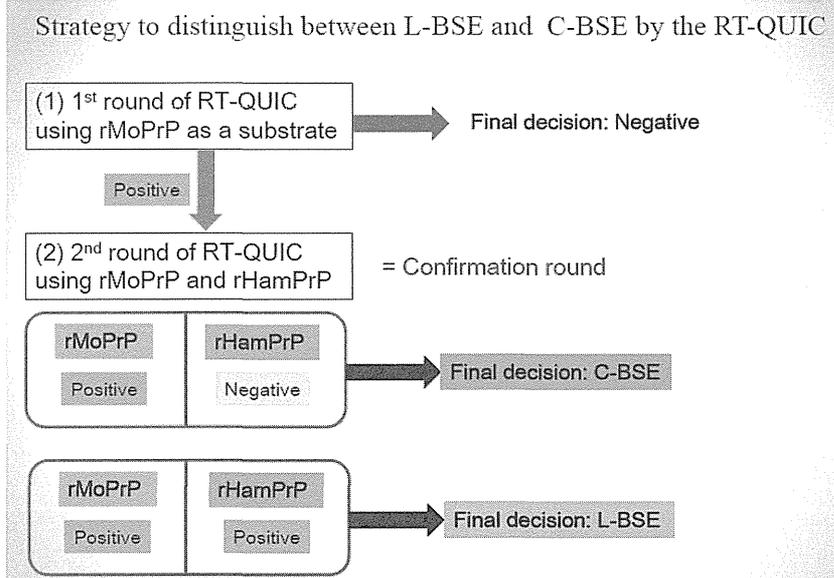
☒ 1



☒ 2



☒ 3



### 3. 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

研究分担者 柴田宏昭 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター  
プロジェクト研究員

研究協力者 小野文子 千葉科学大学  
村山裕一 動物衛生研究所  
岡林佐知 一般社団法人予防衛生協会

#### 研究要旨

非定型 BSE プリオンのヒトへの感染リスクの評価を目的として、カニクイザルへの感染実験を行った。ウシからサルへの種の壁を越えた C-BSE (定型 BSE JP/8 和歌山) 脳内接種サル脳乳剤の継代接種により、潜伏期間の短縮が認められた。L-BSE (非定型 BSE JP/24 佐世保) では初代接種より、短い潜伏期間で発症が認められ、C-BSE に比べて、発症後の神経症状進行は緩徐であった。ほぼ同様の臨床症状ステージで解剖した安楽死後の MRI 画像では C-BSE 接種サルに比べて、L-BSE 接種サルの脳室拡張が顕著で、脳委縮が進行していた。人への感染リスクを評価するうえで必要となる経口接種群においては C-BSE では 11 年、L-BSE では 3 年を経過し、明らかな臨床症状は認められていない。PMCA 法の増幅条件を検討し、L 型非定型 BSE 感染サル由来 PrP<sup>Sc</sup> の超高感度検出が可能になった。脳脊髄液のみならず、尿や唾液中にも発症前より、PrP<sup>Sc</sup> が検出され早期診断に有用と示唆された。

#### A. 研究目的

非定型 BSE プリオン(BSE-P)のヒトへの感染リスク評価指標の確立および定型と非定型 BSE 感染による病態比較を行う目的に、カニクイザル 21 頭を用いて、定型および非定型 BSE 感染牛脳乳剤の接種実験を行った。発症まで定期的臨床症状、運動機能、高次脳機能および脳波を観察、測定し、安楽死後の MRI 所見についての臨床病態解析を行うとともに蛋白および組織病理学的解析を行った。併せて、BSE-P 接種後定期的に採取したサルの血液、脳脊髄液、尿、唾液およ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した。

#### B. 研究方法

##### 1) 供試動物と接種方法

1.4~2.4 歳の育成雄カニクイザル 21 頭を用いた。使用動物は、P3 実験動物施設内のアイソレーターにおいて馴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 時間照明 (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。

##### 2) 実験群および接種材料

実験群について下記に記載する。

##### 第 1 群: C-BSE 初代接種初期検索群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10%脳乳剤を接種した。

経口接種 (脳乳剤 2.0 ml) 2 頭(#1, 2)

腹腔内接種 (脳乳剤 2.0 ml) 2 頭(#3, 4)

各群 1 頭ずつ各々接種後 3 か月、6 か月目に安楽死を行い異常プリオン蛋白の初期対内分布について検索を行った。

##### 第 2 群: C-BSE 初代接種群

カニクイザル 6 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10%脳乳剤を、それぞれの経路で接種した。

経口接種 (脳乳剤 2.0 ml x 3 回) 3 頭(#5, 6, 9)

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 3 頭(#7, 10, 11)

脳内接種群 3 頭は発症後、経口投与群 3 頭中 1 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。2 頭は経過観察中。

### 第3群：C-BSE 第2継代接種群

カニクイザル4頭を下記の2群に分け、第2群で発症したカニクイザル(#7)の材料を用いて、それぞれの経路で接種した。

静脈内接種(血液40.0 ml) 2頭(#12, 13)

脳内接種(脳乳剤0.2 ml) 2頭(#16, 17)

脳内接種群2頭は発症後、輸血群2頭中1頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。1頭は経過観察中。

### 第4群：C-BSE 第3継代接種群

カニクイザル2頭に第3群で発症したカニクイザル(#17)10%脳乳剤を、脳内接種を行った。

脳内接種(脳乳剤0.2 ml) 2頭(#20, 21)

脳内接種群2頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

### 第5群：L-BSE 初代接種群

カニクイザル4頭を下記の2群に分け、BSE(BSE JP/8 和歌山)感染ウシの10%脳乳剤の脳内接種および20%脳乳剤の経口投与を行った。

脳内接種(脳乳剤0.2 ml) 2頭(#14, 15)

経口接種(脳乳剤5.0 ml x 8回) 2頭(#18, 19)

脳内接種群2頭は発症後安楽死を行い検索に供した。経口投与群は経過観察中。

### 第6群：L-BSE 第2継代接種群

カニクイザル2頭に第5群で発症したカニクイザル(#15)10%脳乳剤を、脳内接種を行った。

脳内接種(脳乳剤0.2 ml) 2頭(#22, 23)

脳内接種群2頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

#### 3) 接種および材料採取方法

経口接種は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテテルを胃内に挿入し、前述の投与量にて実施した。

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2 mmの穿孔部を作製し、視床に脳乳剤0.2 ml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。

接種後、定期的に血液および脳脊髄液(CSF)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。

安楽死は塩酸ケタミン筋肉内投与による麻酔後、ペントバルビタール静脈内投与による深麻酔下において放血後過剰量のペントバルビタール

を投与により行った。

#### 4) 解析方法

##### 1. 行動観察

行動観察・ビデオ撮影

アップルテスト(運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

##### 2. 高次脳機能解析

食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルは報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行う。本評価系は#18～#23に実施した。

##### 3. MRI 撮像および画像解析

P3 動物実験区域内で管理されている動物は生存したまま管理区域外への搬出ができないため、MRI 撮像は安楽死直後に密封コンテナに封じ込めてMRI室に搬送した。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、プロトン強調画像、Flair画像を撮像した。また、拡散テンソル画像再構築にあたり12軸Diffusionシークエンスの撮像を行った。

##### 4. L型非定型BSE感染サルの体液中のPrPSc動

## 態解析

定期的に採材された体液類（尿、血液、脳脊髄液および唾液）について解析を行った。超音波処理／界面活性剤で可溶化した白血球分画またはリンタングステン酸沈殿法で濃縮した体液類をシードに用い、連続 PMCA で解析した。各ラウンドの PMCA 産物を Proteinase K 消化後、ウェスタンブロット（WB）法により PrP<sup>Sc</sup> を検出した。

### （倫理面への配慮）

PrP<sup>Sc</sup> 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行った。

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。

本動物実験計画は「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、基盤研動物実験委員会の審査承認を受けた。

## C. 研究結果

### 1) 臨床経過

C-BSE 接種群では、牛脳乳剤接種群（初代）は 27～45 ヶ月の潜伏期を経て 7～14 ヶ月発症期間を要したが、2 代目、3 代目継代接種群では潜伏期間 13～18 ヶ月、発症期間 2～6 ヶ月と短縮し、再現性の高い発症経過を示した。臨床症状は、振戦、ミオクローヌス、小脳失調症状が顕著であったが、認知能は発症末期まで維持していた。L-BSE 接種群においては、初代より潜伏期間 19～20 ヶ月、発症期間 5 ヶ月と C-BSE より強い病原性を示し、2 代目では、潜伏期間 14～16 ヶ月、発症期間 6～10 ヶ月と潜伏期間はわずかに短縮された。L-BSE 接種群は C-BSE 接種群に比べ、発症からの症状進行が緩徐で、神経症状に先行して認知機能の低下が認められた。C-BSE 牛脳乳剤を経口投与した動物は接種後 11 年、L-BSE を経口投与した動物は、3 年を経過し未発症である（図 1）。

### 2) 脳 MRI 画像解析

安楽死直後の MRI 撮像において、BSE 脳内接種カニクイザルでは、全頭において、脳室拡張を

伴う脳萎縮の所見が認められた。運動失調、振戦等神経症状は C-BSE 接種サルの方が重度であったが、MRI 像における脳室拡張は、L-BSE 接種群の方が顕著であった（図 2）。

### 3) PMCA 法による L 型非定型 BSE 感染サルの体液中の PrP<sup>Sc</sup> 動態解析

L 型非定型 BSE 感染カニクイザル由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅条件の検討では、脳乳剤基質、超音波条件およびポリアニオンの選別に加え、プリオン蛋白質のフォールディングに影響を与える薬剤（変性剤や安定化剤等）の効果も検討した。感染研から導入済の非定型 BSE 脳内接種サルの脳乳剤をシードに用いて PMCA 増幅条件を検討した。ポリアニオン存在下、アルギニンを経基質に添加すると増幅効率が飛躍的に改善されることを見いだした。アルギニンのグアニジウム基が増幅促進効果を発揮している可能性がある。図 3 に、マウス脳乳剤を基質に用いて連続 PMCA により増幅した結果を示す。ラウンド 6 (R6)以降、10%感染脳乳剤を 1010 倍に希釈したサンプル 4 つのうち、一つから PrP<sup>Sc</sup> が検出された。アルギニン添加により、検出感度は約 10 万倍向上した。

L-BSE2 代目接種群（#22, 23）より発症前より経時的に採材した体液サンプルを用いて PMCA 法により、PrP<sup>Sc</sup> 動態を解析した。接種した 2 頭とも、発症期に採取した脳脊髄液、尿および唾液サンプルよりは検出された。また、脳脊髄液サンプルにおいては接種後 11～13 ヶ月と発症前から PrP<sup>Sc</sup> が検出されており、#22 では唾液から、#23 では尿から発症前に PrP<sup>Sc</sup> が検出された（図 4、5）。

Ns（シードを含まない基質のみ）サンプル（陰性コントロール）では、6 つのサンプルで増幅し、増幅産物を 1/5 継代する連続 PMCA 後、WB で PrP<sup>res</sup> を検出した。R8 まで PrP<sup>res</sup> シグナルは生成されなかった（図 6）。

## D. 考察

BSE プリオン脳内接種によるカニクイザルへの馴化により、再現性の高い発症モデル系が確立できた。臨床症状および病理所見から、C-BSE（定型 BSE JP/8 和歌山）接種カニクイザルは v-CJD に、L-BSE（非定型 BSE JP/24 佐世保）では s-CJD に類似したモデル系であることから、霊長類への非定型 BSE 感染実験により、感染リスク評価のみならず、人 CJD 病態解明、治療研究に有用なモデルとなりうる可能性が示唆された。人への感染リスクを評価するうえで必要となる経口接種群においては C-BSE では 11 年、L-BSE では 3 年を経

過し明らかな臨床症状は認められていない。しかし、v-CJD における暴露から発症までの潜伏期間は 8 年～10 年であることから今後、高次脳機能を含めた臨床症状発現の詳細な解析を行うとともに、PMCA 法を用いた早期診断が重要となる。なお、P3 動物施設における長期飼育については、動物福祉に配慮した管理（コングトイの導入、青果給餌、相互にアイコンタクトが可能なアイソレーター配置等）を行うとともに、定期的な行動実験による、人との触れ合いが福祉向上に有効と考える。L 型非定型 BSE 感染サル由来 PrP<sup>Sc</sup> については、アルギニンを増幅用基質に添加することによって超高感度検出が可能になった。感染サルの脳脊髄液のみならず、尿や唾液中にも発症前より、PrP<sup>Sc</sup> が検出され早期診断が可能となった。

#### E. 結論

カニクイザルへの C-BSE および変異型 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が確立した。確立した発症モデル系を用いて多角的に解析することによって、人への感染リスク評価、プリオン病の発症機序解明、早期診断法

確立、治療研究への有用性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1) Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T. Ultrasensitive detection of PrP<sup>Sc</sup> in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J. Gen. Virol.* 95(11): 2576-2588, 2014.

#### 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  
なし

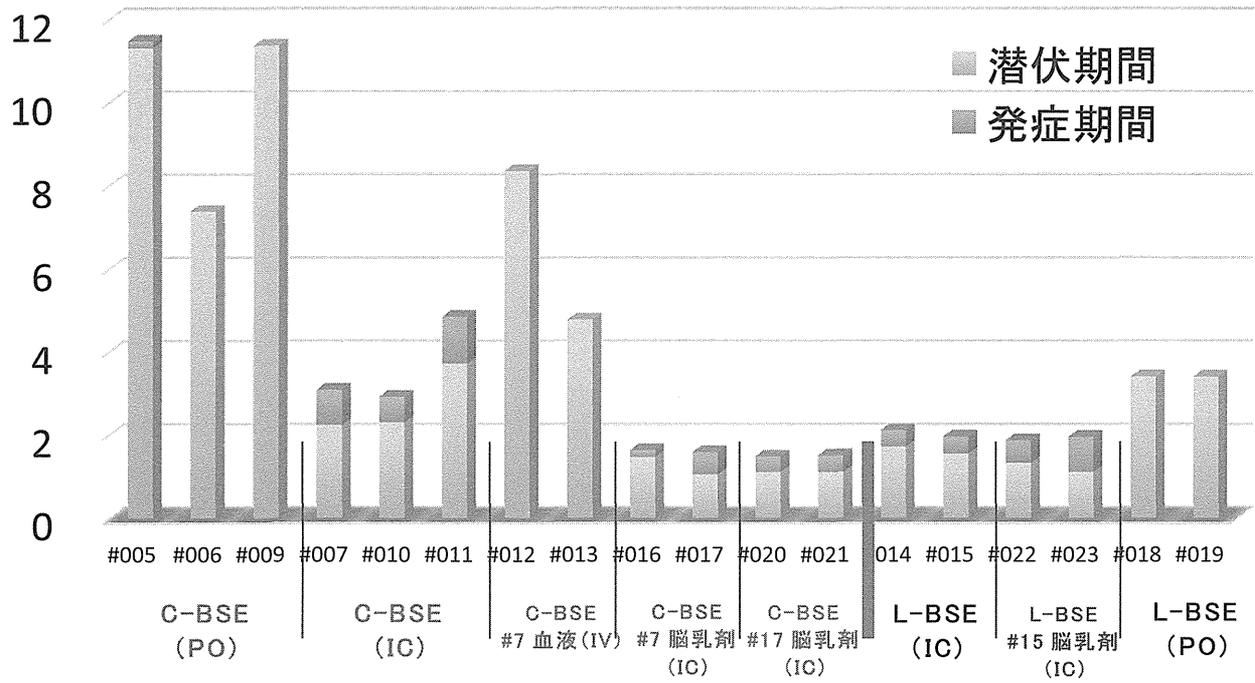


図1. BSE 接種カニクイザル発症経過

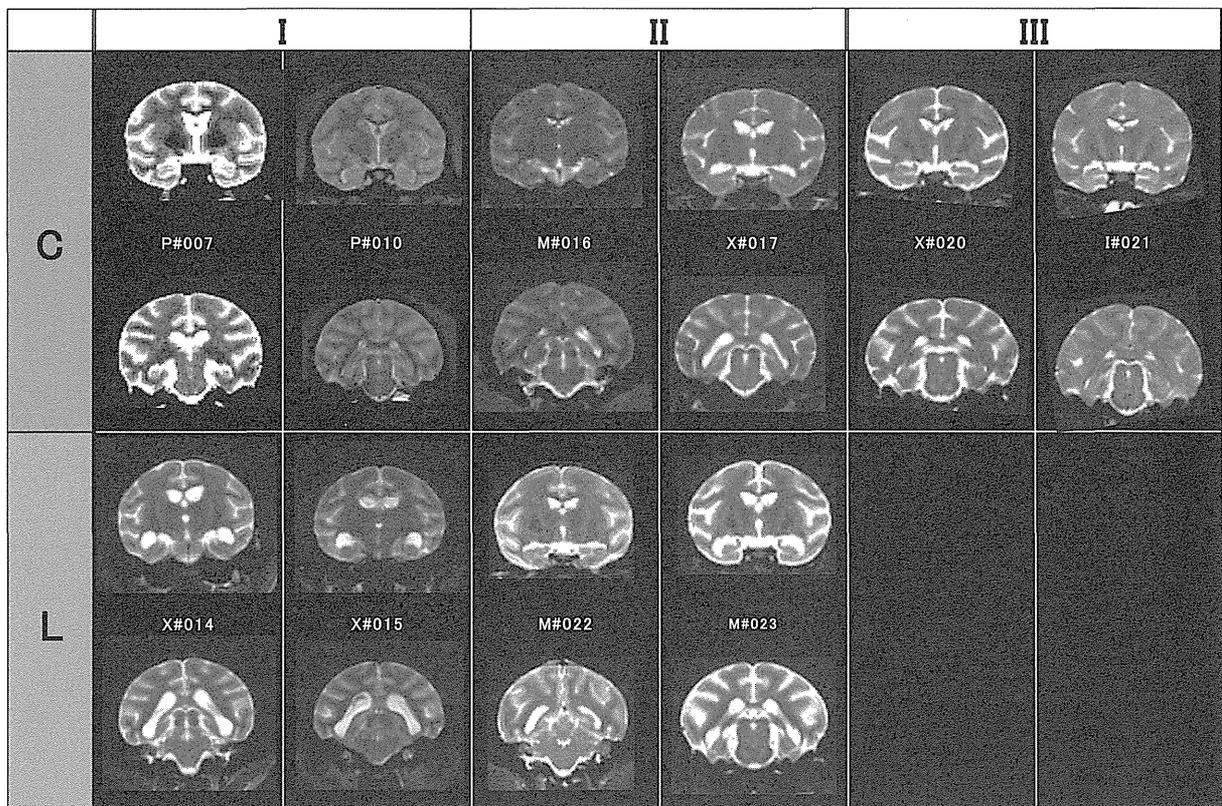


図2. 安楽死直後に実施したMRI撮像による脳室拡張 (T2強調画像)

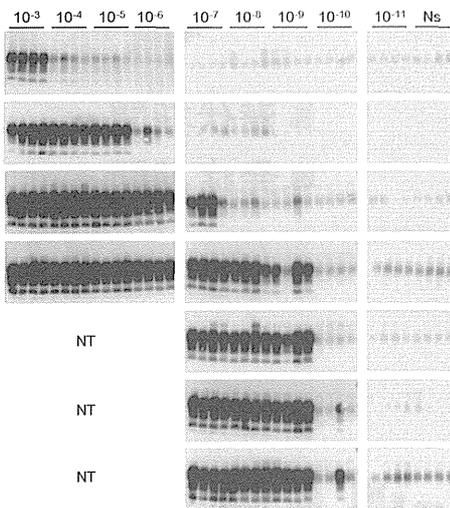


図3. L型非定型BSE感染サル由来のPrP<sup>Sc</sup>のPMCA増幅結果. 10%感染脳乳剤をポリアニオンおよびアルギニンを添加した基質(正常マウス脳乳剤)で10<sup>-3</sup>~10<sup>-11</sup>に希釈し、4つのサンプルを連続PMCAにより増幅した。各ラウンド(R1~R7)のPMCA産物をプロテアーゼ消化後、ウェスタンブロット法でPrP<sup>Sc</sup>を検出した。NT: not tested

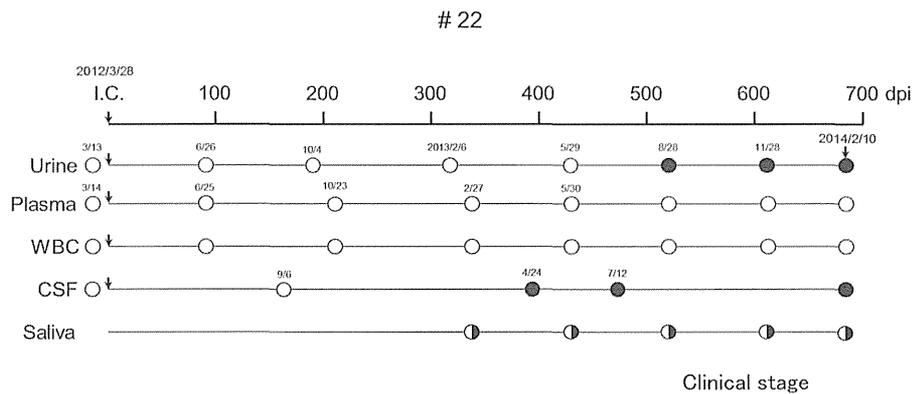


図4-1. L型非定型BSE感染サル(Cy22)の体液中のPrP<sup>Sc</sup>動態. 脳内接種(I.C.)後、定期的に体液類を採材し連続PMCA法で解析した。増幅はduplicateで行い、結果は両方陽性、片方陽性、両方陰性で示す。dpi: days post inoculation. 黄色に着色した期間は発症期を示す。

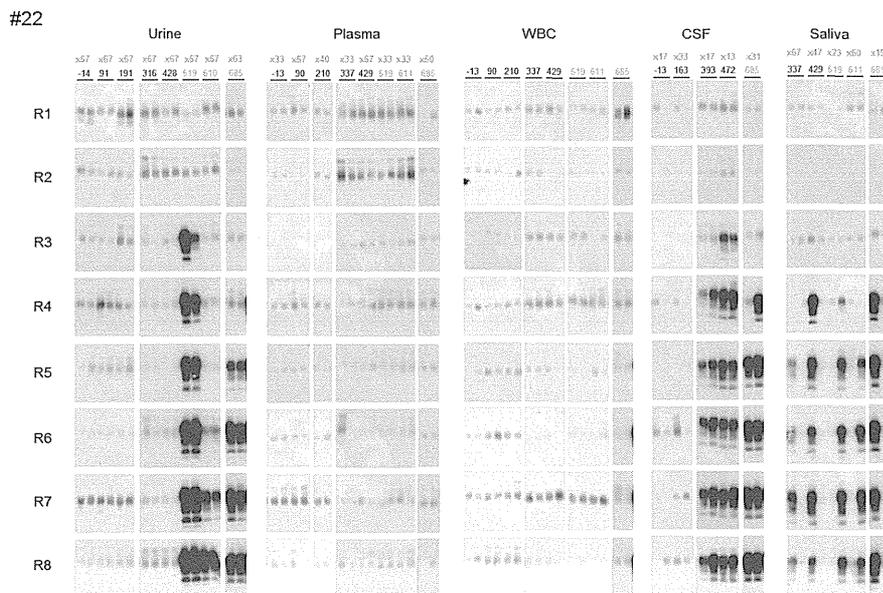


図4-2. 図4-1のウェスタンブロット。各サンプルは、リンタングステン酸Na沈殿法により濃縮した(各サンプルの濃縮倍率は赤字で示す)。WBCは10<sup>6</sup>個相当/サンプル。黒字(未発症時)および青字(発症時)は脳内接種後経過日数を示す。

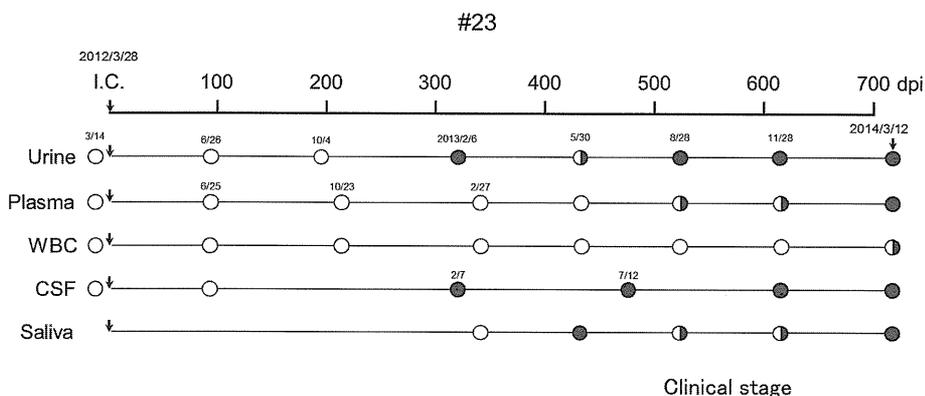


図5-1. L型非定型 BSE 感染サル (Cy23) の体液中の PrP<sup>Sc</sup> 動態. 脳内接種(I.C.)後、定期的に体液類を採材し連続 PMCA 法で解析した。増幅は duplicate で行い、結果は両方陽性、片方陽性、両方陰性で示す。dpi: days post inoculation. 黄色に着色した期間は発症期を示す。

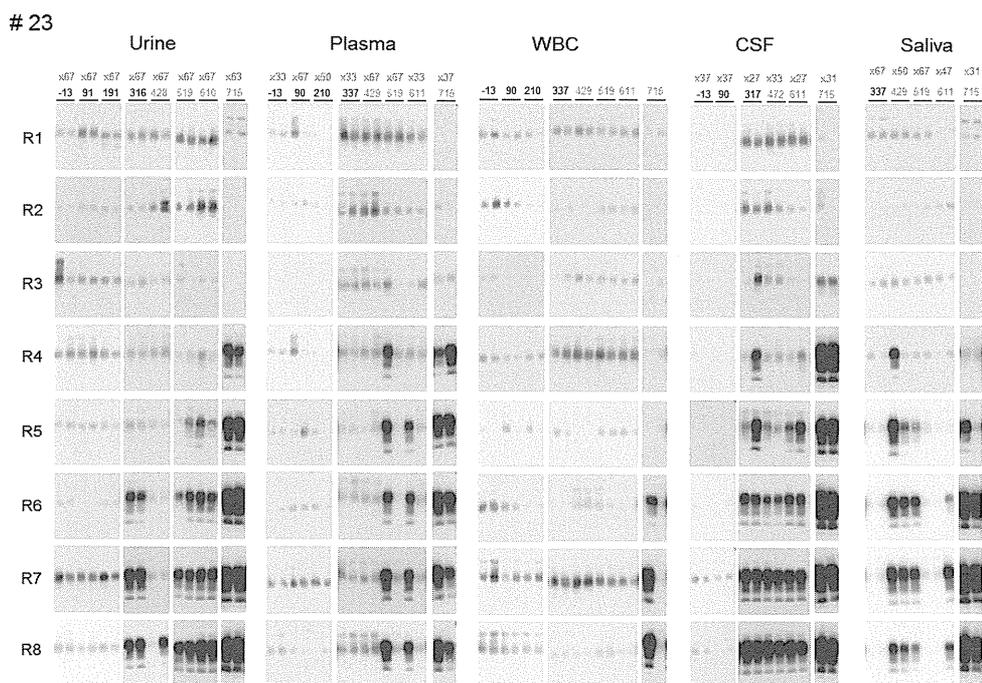


図5-2. 図5-1のウエスタンブロット。各サンプルは、リンタングステン酸 Na 沈殿法により濃縮した (各サンプルの濃縮倍率は赤字で示す)。WBCは  $10^6$  個相当/サンプル。黒字 (未発症時) および青字 (発症時) は脳内接種後経過日数を示す。



図6. Ns (シードを含まない基質のみ) サンプル (陰性コントロール)

## 4. 非定型BSE感染サルの神経病理学的解析

研究分担者 飛梅 実 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究協力者 佐藤 由子 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

### 研究要旨

定型 BSE (C-BSE) 由来プリオン (以下 c-BSE) 接種サルではヒト vCJD と同様の病態進行と、病理組織学的特徴を示す。本邦でも確認された非定型 BSE (L-BSE) のヒトへの感染事例は確認されていないが、サルモデルを用いてヒトへのリスク評価及びその推定される病原性、病理組織学的特徴を明らかにする。

### A. 研究目的

定型 BSE (C-BSE) 由来プリオン (以下 c-BSE) 接種サルではヒト vCJD と同様の病態進行と、病理組織学的特徴を示す。本邦でも確認された非定型 BSE (L-BSE) のヒトへの感染事例は確認されていないが、サルモデルを用いてヒトへのリスク評価及びその推定される病原性、病理組織学的特徴を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

1) 本邦で確認された非定型 BSE 感染ウシ由来プリオン (以下 L-BSE) を接種したカニクイザル脳組織を検討材料として用いた。接種 1 代目および 2 代目 (継代接種) を比較検討し、継代における病理組織学的な特徴の維持について検討する。また、C-BSE 接種サルの継代における病理組織学的特徴と比較検討し、その性状の差異について検討する。

2) 定型 BSE 由来プリオンと非定型 BSE 由来プリオンの生化学的な性状は、異なることが報告されている。免疫組織化学的手法を用いた検出においても、前処理法等の最適化が必要とされることが考えられる。本研究では、従来の C-BSE 由来プリオンの免疫組織化学的検出法を基に、L-BSE 由来プリオンの最適検出条件の検討を行う。また、使用抗体の選別等についても検討し、免疫組織化学的手法によるプリオン種鑑別法についても検討する。

#### (倫理面への配慮)

ヒトを対象にした研究倫理指針に該当しない。サルを用いた実験については予防衛生研究所規定の指針を順守するとともに、動物愛護精神に基づき研究を行っている。

### C. 研究結果

1) 継代 2 代目の L-BSE 接種サルの脳組織を病理学的に検討した結果、大脳皮質の高度の空胞変性を認め、シナプスタイプのプリオン沈着パターンを認めた。一方、小脳では初代接種と同様に髄質の空胞変性が高度であったが、分子層においてプラーク型の沈着も認められた (図 1)。また、各臓器におけるプリオン沈着について検索したが、中枢神経系以外へのプリオン沈着は認められなかった (図 2)。

2) C-BSE 由来プリオン感染サル脳組織ではパラフィン包埋切片の前処理に 1mM HCl を用い、検出は T4 抗体を用いている。同様の染色条件を用いて L-BSE 感染サル脳組織の検索を行った結果、L-BSE 由来プリオンも検出可能であった。しかし、高度の空胞変性を有する L-BSE 感染サル脳組織ではプリオン沈着部位と非病変部の S/N 比が C-BSE 感染サル脳組織に比べ低下した。

前処理法を 100mM NaOH 及び PK 処理に変更した場合、L-BSE 感染サル脳組織においてプリオン沈着部位と非病変部の S/N 比の向上が認められた。また、シナプスタイプのプリオン沈着も小顆粒の集合により構成されていることが分かった。C-BSE 感染サル脳組織においては前処理法の変更による染色性の向上は明らかではなかった。

また、検出抗体を 12F10 抗体に変更したところ、L-BSE 感染サル脳組織では NaOH 処理により顕著に染色性が低下した。C-BSE 感染サル脳組織では変化は無かった (図 3)。

### D. 考察

1) L-BSE 由来プリオン感染サル脳組織病変は、接種 1 代目並びに継代 2 代目において大きな変

化は無く、固定された病原性を示すと考えられた。高度の空胞変性とシナプスタイプのプリオン沈着を示し、ヒト孤発性 CJD と同様の病理所見であった。ヒト孤発性 CJD はシナプスタイプのプリオン沈着を示し、病態は亜急性の進行を示す。L-BSE 由来プリオン接種サルにおいても、病態進行は C-BSE 接種群に比べ急速であることが接種後の経過観察により明らかとなっており、病理所見と病態の相関性が認められた。C-BSE に由来するヒト非定型 CJD (vCJD) では中枢神経系のみならず、リンパ系組織にもプリオン沈着が認められている。サル脳内接種群では C-BSE および L-BSE 接種ともに中枢神経系のみが存在しており (図 2-1、2)、投与ルートによるものか否かについて検討の必要がある。

2) NaOH 前処理による染色性の向上により、高度の空胞変性により実質の脱落する L-BSE 由来プリオン感染サル脳組織におけるプリオン沈着量は比較的高度であることが示唆された。また、NaOH 前処理と 12F10 抗体による染色により、シグナルが高度に減衰したことから、C-BSE 由来プリオン感染との鑑別診断への応用が示唆された。

## E. 結論

亜急性の病態進行と高度の空胞変性誘導、シナプスタイプのプリオン沈着は固定された L-BSE 由来プリオンの病原性と推察された。この表現型はヒト孤発性 CJD と同様であり、ヒトへ L-BSE 由来プリオンが侵入した場合鑑別が難しいことが示唆される。今後、現在進行中の経口投与サル実験群の病理学的解析を行うとともに、C-BSE 由来プリオン感染サルおよびヒト孤発性 CJD 症例との相違点を抽出し、ヒトへの L-BSE 由来プリオンの病

原性並びに他プリオン病との鑑別法について検討する。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T. Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J. Gen Virol.* 2014 Nov;95(Pt 11):2576-88

### 2. 学会発表

1) 103 回日本病理学会総会 Val210Ile 変異を有する CJD の 1 剖検例 2014. 04. 24-26 広島 辻 隆裕、石井保志、伊丹弘恵、柳内 充、深澤雄一郎、矢口裕章、水戸泰紀、田島康敬、飛梅 実

## 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

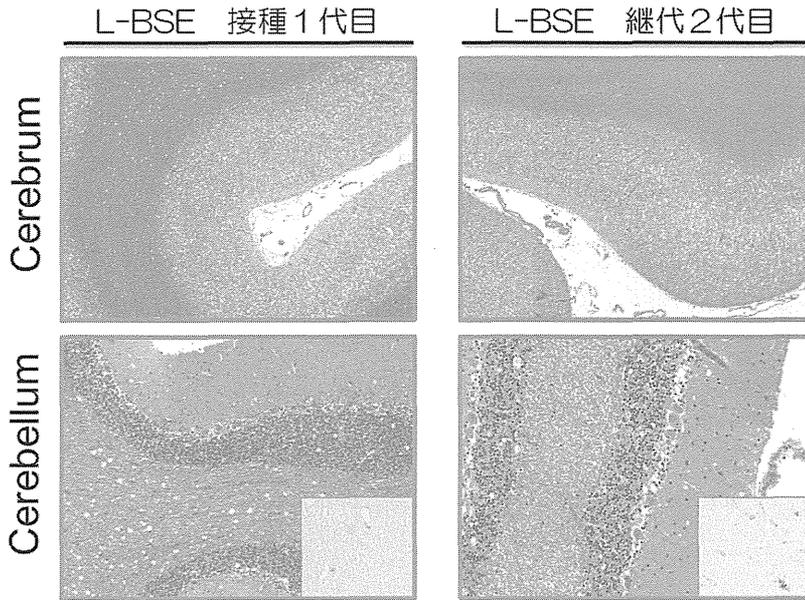


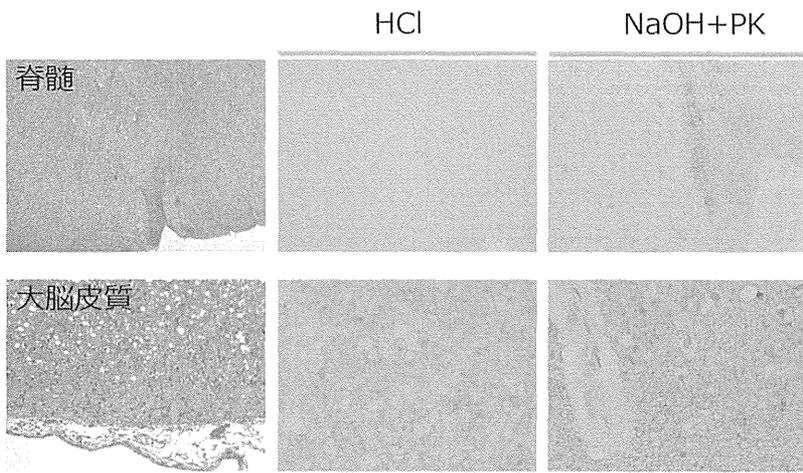
図 2-1

	L-BSE	C-BSE		L-BSE	C-BSE		L-BSE	C-BSE
肺	-	-	下垂体	+	+	脾臓	-	-
心	-	-	甲状腺	-		扁桃	-	-
肝	-	-	副腎	-		顎下リンパ	-	-
膵	-	-	精巣	-		深頸リンパ	-	-
胃	-	-	耳下腺	-		腋窩リンパ	-	-
小腸	-	-	顎下腺	-		胸腺	-	-
盲腸	-	-	骨格筋	-		縦隔リンパ	-	-
結腸	-	-	皮膚	-		腸骨リンパ	-	-
直腸	-	-	骨髄	-		腸間膜リンパ	-	-
						鼠径リンパ	-	-

図 2-2

	L-BSE	C-BSE
坐骨神経	-	-
正中神経	-	-
交感神経	-	-
副交感神経	-	-
三叉神経	-	-
視神経	+	+
嗅球	+	+

図 3



## 5. 霊長類モデルへの伝播による非定型 BSE プリオンの 蛋白質化学解析

研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所 細胞化学部 第1室室長）

研究協力者 柴田 宏昭（（独）医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）  
小野 文子（千葉科学大学）

### 研究要旨

（独）医薬基盤研究所において進めてきた非定型L-BSEプリオンのカニクイザルへの2代目伝播実験（脳内接種）が完了した。そこで、この実験により得た組織材料についてウエスタンブロット法によるPrP<sup>Sc</sup>の蓄積・分布の分析を行い、本研究班がこれまでに得た従来型BSE（C-BSE）プリオンを伝播させたサルおよびL-BSEプリオンを初代伝播させたサルにおけるPrP<sup>Sc</sup>の蓄積・分布の特徴と比較した。また一連の研究においてはサル個体のPrPアミノ酸配列が重要な意味を持つため、遺伝子のPrPコード領域の塩基配列を分析することでアミノ酸配列情報を確認した。さらに、欧州およびカナダにおいて、当地において使用されている迅速ELISAキットの非定型BSEプリオンへの反応性の評価試験が実施されたことを考慮し、本邦のBSEスクリーニング検査で使用中の迅速ELISAキットについても同様の評価試験を行い、ELISAキットの有効性を示した。

### A. 研究目的

本年度は非定型 L-BSE プリオンのカニクイザルへの2代目伝播実験を進め、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積・分布について L-BSE プリオンの初代伝播ザルや従来型 BSE（C-BSE）プリオン伝播ザルと比較することにより、霊長類モデルで増殖する C-/L-BSE プリオンの特性について知見を深めることを目的とした。また一連の実験では、カニクイザル各個体の PrP についてアミノ酸変異の有無を確認する必要がある。この目的のため、PrP コード領域の DNA 塩基配列を分析した。

また、食肉衛生検査所で用いられている BSE 検査キットについては C-BSE プリオンの検出能を指標にキットの有効性が承認済みだが、非定型 BSE プリオンに対する反応性についてはこれまで問われていない。そこで、非定型 BSE に対するキットの有効性を調査することを目的とした評価研究を実施した。

### B. 研究方法

#### 1) カニクイザルの PrP 遺伝子の解析

-80℃に保管したサル各個体の組織片やホモジネートより、NucleoSpin Tissue XS を用いてゲノム DNA を調製した。DNA 塩基配列の分析に供する

ため、組織片等は PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が少ない、またはウエスタンブロット分析の検出限界以下の部位を用い、中間処理過程では終濃度 2-2.5M 塩酸グアニジンを添加した。最終調製した DNA サンプルの PrP<sup>Sc</sup> の混入は、ウエスタンブロット分析の検出限界以下であった。この DNA を鋳型として、primer-1: 5'-TTCATCAAGTCCATAACTTAGGGTCAG-3'、primer-2: 5'-CCTATCAGGGACAAAGAGAGAAGCAAG-3'、および KOD plus polymerase を用いた PCR により、PrP コード領域を含む(-339~+883) DNA 断片を得た。この DNA 断片より1本鎖 DNA を調製し、dideoxy 法 (BigDye) により塩基配列分析を行った。

#### 2) カニクイザル脳組織等に蓄積した PrP<sup>Sc</sup> のウエスタンブロット分析

非定型 L-BSE プリオンを脳内接種（2代目伝播）したカニクイザル#022、#023 について、脳、延髄、橋、脊髄、脾臓、扁桃の各部位の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量をウエスタンブロット法により調べた。また、糖鎖型などの PrP<sup>Sc</sup> の生化学的特徴を調べた。対照として、非定型 L-BSE プリオンを初代脳内接種した#014(2009年採材)、および従来型 BSE(C-BSE) プリオンを脳内接種した（2代目伝播）#016、#017

(2009年採材)を併せて分析にかけた。

### 3) 食肉衛生検査所等での BSE スクリーニングに使用されている迅速 ELISA キットの性能評価

本邦の市販キット3点 (TeSeE BSE、フレライザ BSE、ニッピブル BSE) および対照キットとして欧州で使用されているキット (BetaPrion BSE) について、L-BSE プリオン罹患ウシ (JP24) の脳神経組織を被検体としてキットの有効性を試験した。試験は、欧州およびカナダで実施された評価試験の方法 (PlosOne, 7, e43133 (2012); J. Vet. Diagn. Invest. 24, 976 (2012)) に準拠し、感染ウシ脳ホモジネートの2倍希釈系列を健常ウシ延髄ホモジネートにスパイクしたものを試験検体とした。

(倫理面、バイオセーフティ等への対応)

感染性材料の取扱い・分与については、国立感染症研究所が定める規定および指針を遵守した。動物への感染実験は、医薬基盤研 (動物実験実施機関) の動物実験委員会の審査承認を受けて実施した。動物実験で得られた生物材料の取扱いは国立感染症研究所の動物実験実施規定に従った。

## C. 研究結果

### 1) カニクイザルの PrP 遺伝子の解析結果

PrP コード領域を含む全長 1.2kbp (-339~+883) の DNA 断片の塩基配列分析を行った。今年度までに 8 頭 (#007、#010、#011、#014、#015、#016、#022、#023) の分析を終えた。幾つかのコドン多型が検出されたが、アミノ酸変異を生じないサイレント変異だった [表 1]。この情報は、感染実験の結果を正しく解釈するために必須の情報である。残りの個体 (#017、#020、#021) についても、今後分析を進める。

### 2) カニクイザル脳組織等に蓄積した PrP<sup>Sc</sup> のウェスタンブロット分析

L-BSE プリオンの2代目伝播ザル (#022、#023) では、大脳の各部位に比して小脳、橋、延髄の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積レベルが低いという特徴が認められた [図 1 A]。L-BSE プリオンの初代伝播ザル [図 1 B; #014] においてもこの特徴は認められ、サルへの2代伝播を経ても PrP<sup>Sc</sup> の分布の特徴が維持されることがわかった。一方、C-BSE プリオンの2代目伝播ザル [図 1 B; #017] と比較すると、C-BSE プリオン接種ザルでは PrP<sup>Sc</sup> が小脳、延髄

にも比較的多く蓄積していた。すなわち、カニクイザルを感染宿主とし、プリオンの脳内接種という実験条件下においては C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの組織分布のトロピズムに違いがあるらしいことが示された。

### 3) 迅速 ELISA キットの性能評価

本邦で使用されている迅速 ELISA キット3点 (TeSeE BSE、フレライザ BSE、ニッピブル BSE) が、L-BSE 罹患ウシの摘発にも有効であることを示した。欧州で評価試験が行われた BetaPrion BSE を国外の対照キットとして一緒に試験した結果、L-BSE プリオンの検出感度は、高感度の順に BetaPrion BSE  $\geq$  ニッピブル BSE > フレライザ BSE > TeSeE BSE、の順となった。これらの4キットともに、C-BSE プリオンと L-BSE プリオンへの反応に優位性の差は無く、同レベル量の BSE プリオンならば、C-型/L-型のどちらも ELISA 測定値はほぼ同じ値となった。先の欧州の評価試験 (PlosOne, 7, e43133 (2012)) において、TeSeE BSE ならびに BetaPrion BSE は L-BSE 罹患ウシの迅速検査キットとしての有効性が承認されている。従って、本邦で使用されている迅速 ELISA キット3点は、欧州の評価基準に照らしても L-BSE 罹患ウシの摘発に有効と判断される結果となった。

## D. 考察

本研究班で推進するカニクイザルへの C-/L-BSE プリオンのモデル感染実験では、個体の PrP のアミノ酸配列を把握しておくことが極めて重要である。そこで、個体の PrP 遺伝子の解析を進めた。これまでに解析を終えた8頭については PrP のアミノ酸変異が無いことが確認でき、実験結果を考察する上でサル個体の PrP のアミノ酸変異の異同は考慮不要となることが示された。なお、いずれの個体も、クロイツフェルト・ヤコブ病との関連が指摘されている 129 番目のアミノ酸は Met/Met、219 番目のアミノ酸は Glu/Glu だった。分析未了の3個体についても、早急に解析を終えて実験の基盤となる情報を確立させたい。

並行して、BSE プリオンのカニクイザルへの伝播実験により本年度までに得た組織材料について、ウェスタンブロット法により PrP<sup>Sc</sup> を検索した。その結果、カニクイザルに感染した C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの組織分布には相違が認められた。C-/L-BSE プリオンの組織分布は、

初代感染個体と2代目感染個体でC-/L型に特徴的な傾向をそれぞれ維持しており、継代を経てもPrP<sup>Sc</sup>の組織分布の特徴は維持されるらしい。霊長類モデルで示されたこのような病原体分布の特徴は、既知あるいは未知のヒト・プリオン病と非定型L-BSEとの関連について考察を進める上で興味深い知見と思われる。なお、ウェスタンブロット分析において、元の感染ウシの脳組織に検出されたPrP<sup>Sc</sup>の糖鎖型は、C-/L-BSEプリオンの相違が明瞭であった(L-BSEプリオンの1糖鎖型PrP<sup>Sc</sup>バンドの相対シグナル強度が強い、かつ、無糖鎖型バンドが低分子量側へシフトする)。このウェスタンブロット分析上の見かけの相違はカニクイザルへの伝播により曖昧化した。カニクイザルで増殖させたC-/L-BSEプリオンの近交系マウスへ対する病原性には明らかな相違があることは研究分担者らのこれまでの研究において示されている。このような病原性の相違は究極的にはC-/L-BSEプリオンのPrP<sup>Sc</sup>凝集体構造の差に因ると想像され、次年度以降はこの差についての解析を進めたい。なお、本年度に行ったウェスタンブロット法による分析では、L-BSEプリオンを脳内接種したサル個体の脾臓および扁桃はPrP<sup>Sc</sup>陰性だった。

本邦で使用されている迅速ELISAキット3点については、L-BSE罹患ウシの摘発に有効であることが示された(注: TeSeE BSEは2014年4月より国内販売中止、フレライザ BSEは、2014年4月より製造中止となった)。試料の入手にかかる問題から、本年度は非定型H-BSEプリオンに対する評価試験を残念ながら実施できなかった。この点は、次年度以降の課題としたい。

## E. 結論

非定型BSE感染ザルで増殖するPrP<sup>Sc</sup>の蛋白質化学的解析を行うにあたり、本年度はまず、サル個体のPrPのアミノ酸配列を確認するためにPrP遺伝子の塩基配列を決定した。また、本年度に得

たL-BSEプリオンの2代目伝播ザルの神経組織等におけるPrP<sup>Sc</sup>の分布について、過去に得たL-BSEプリオンの初代伝播ザルおよびC-BSEプリオンの2代目伝播ザルの神経組織材料と比較し、L-BSEプリオンとC-BSEプリオンのPrP<sup>Sc</sup>の小脳、延髄への分布に相違が認められることを示した。未だ初期分析の段階につき、今後、別の抗PrP抗体を使用するなど、異なる分析条件下での再現性を確認したい。本年度の研究の一環として、迅速ELISAキット3点についての評価試験研究を行った。TeSeE BSEを除いた「フレライザ BSE」と「ニッピブル BSE」は、純国産キットであり、特にこの2キットが欧州の評価基準に照らしてもL-BSE罹患ウシの摘発に有効と判断される結果となったことは、我が国の現在までの食肉衛生検査所でのBSEスクリーニング検査の有効性を国際的にアピールする上で意義深いと考えられる。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

無し

### 2. 学会発表

無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

無し

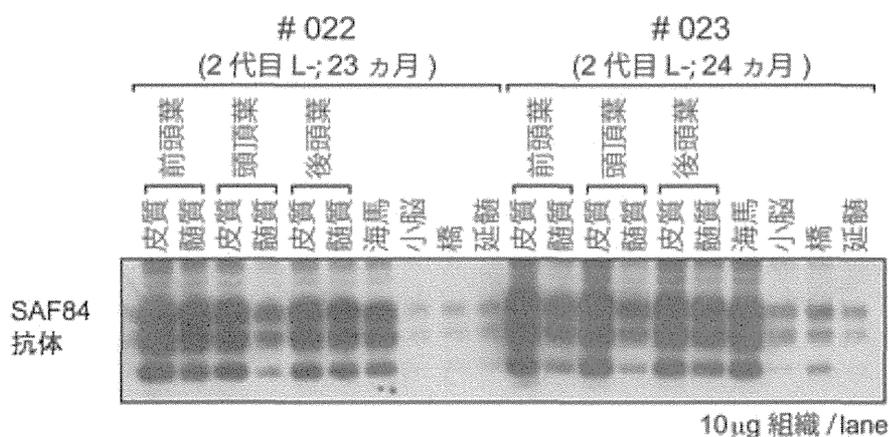
### 2. 実用新案登録

無し

表1 PrP 遺伝子の解析結果

個体 #	伝播実験	コドン (いずれもアミノ酸の変異は生じない)
7	C-BSE プリオン 初代伝播	Y145=TAT/TAC、Y163=TAT/TAC
10	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
11	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
16	C-BSE プリオン 2代目伝播	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
17	同上	未了
20	C-BSE プリオン 3代目代伝播	未了
21	同上	未了
14	L-BSE プリオン 初代伝播	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
15	同上	P39=CCA、C179=TGT、T192=ACT
22	L-BSE プリオン 2代目伝播	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
23	同上	P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC

### A. L-BSEプリオンの2代目感染ザル(2匹)の脳内PrP<sup>Sc</sup>の蓄積



### B. 感染ザルの脳内PrP<sup>Sc</sup>の蓄積レベルの比較

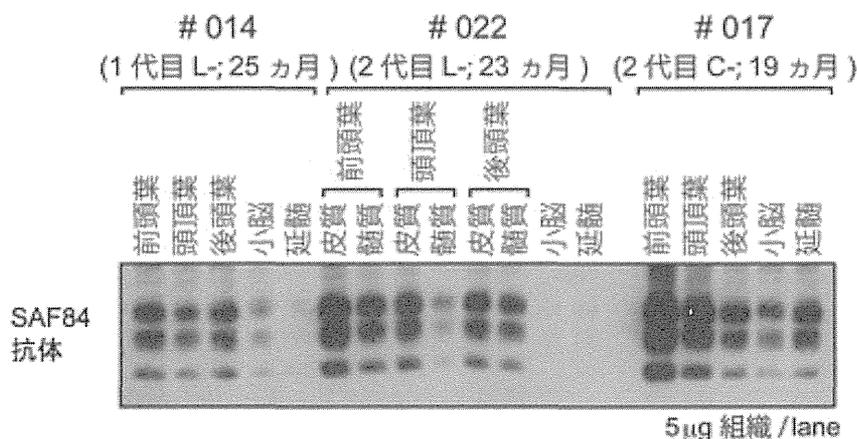


図1 ウェスタンブロット分析の一例

## 6. 潜在的な非定型 BSE の調査のための RT-Quic 法の立ち上げ

研究分担者 長谷部 理絵 北海道大学大学院・獣医学研究科

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

### 研究要旨

英国で発生して世界各地に広がった BSE (定型 BSE) は、現在その発生は制御下にある。しかし、能動サーベイランスの結果、定型 BSE とは性質が異なる BSE (非定型 BSE) が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。我が国では定型 BSE の清浄化に伴い、BSE に対する管理措置が緩和される方向で進んでいる。しかし、非定型 BSE の性状は不明な点が多いことから、主に高齢牛を対象とした適切な管理措置の実施のために非定型 BSE に関する科学的知見や、実際の存在状況等の集積が必要である。長崎大学が、先の食品の安全性確保推進研究事業 (平成 23-25 年実施) で、Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-Quic) 法による L 型非定型 BSE の高感度検出法を確立した。そこで、スクリーニングで使用されている ELISA 法よりも 1000 倍以上高い感度で PrP<sup>Sc</sup> を検出できる RT-Quic 法を用いて、潜在的な非定型 BSE の調査を計画した。本年度は、北海道大学に RT-Quic 法の技術移転を行い、安定して必要な精度と感度が得られる反応条件を検討した。その結果、rMoPrP を用いた場合の 50% seeding dose (SD<sub>50</sub>) が 10<sup>-8.2</sup>、rHaPrP を用いた場合の 50% seeding dose (SD<sub>50</sub>) が 10<sup>-8.5</sup> と調査に必要な感度を達成できた。この方法を用いて、BSE スクリーニング 1 次検査で陽性もしくは擬陽性と判定され、確認検査で陰性と確定した 5 検体を調べたが、全て陰性と判定された。来年度はこの方法を用いて、高齢牛を対象に潜在的な非定型 BSE の調査を進める。

### A. 研究目的

英国で発生して世界各地に広がった BSE (定型 BSE) は、飼料規制などの管理措置が有効に機能して、現在その発生は制御下にある。しかし、能動サーベイランスの結果、定型 BSE とは性質が異なる BSE (非定型 BSE) が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。非定型 BSE は、主に PrP<sup>Sc</sup> の分子性状から L 型、H 型に分類され、これまでに 80 例強が確認されている。非定型 BSE は定型 BSE と異なり、ウシで自然発生するプリオン病である可能性も指摘されている。我が国では定型 BSE の清浄化に伴い、BSE に対する管理措置が緩和される方向で進んでいる。しかし、非定型 BSE の性状は不明な点が多いことから、主に高齢牛を対象とした管理措置の継続が望まれている。適切な管理措置の策定のために非定型 BSE に関する科学的知見や、実際の存在状況等の集積が必要である。Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-Quic) 法は、簡便かつ高感度に PrP<sup>Sc</sup>

を検出可能な方法である [1, 2]。実際に、スクリーニングで使用されている ELISA 法よりも 1000 倍以上高い感度で PrP<sup>Sc</sup> を検出できる。先の食品の安全性確保推進研究事業 (平成 23-25 年実施) で、長崎大学が、RT-Quic 法による L 型非定型 BSE の高感度検出法を確立したので、この方法を用いて高齢牛を対象に潜在的な非定型 BSE が存在する可能性を調べることを計画した。RT-Quic 法では、基質となる組換え PrP タンパク質のロット、RT-Quic 法に使用する機器の性能等により結果が左右されることから、再現性よく RT-Quic 法を実施する必要である。そこで本年は、北海道大学に RT-Quic 法の技術移転を行い、安定して必要な精度と感度が得られる体制の整備を進めた。

### B. 研究方法

#### 1) 組換えタンパク質の精製

原核細胞発現ベクター (pET11a [マウス (Mo)PrP] あるいは pET41a [ハムスター (Ha)PrP])

を、BL21(DE3)pLys に導入し、自動誘導培地 (Magic Media, Invitrogen) で 30 時間、37°C で培養した。菌体を回収し、Cell lytic B cell lysis reagent (Sigma) で処理後、benzonase と lysozyme で処理し、封入体を回収した。封入体を 6 M GdnHCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> および 10 mM Tris を含む変性 buffer (pH 8.0) で可溶化し、Ni-NTA アフィニティー担体 (Qiagen) に結合させた。その後、カラムに充填し、GdnHCl の濃度を 18 時間かけて 0 M にすることで担体上で PrP 分子をリフォールディングさせた。その後、500 mM Imidazole, 10 mM Tris (pH 5.8) を用いて 0~500 mM の Imidazole 濃度勾配により PrP 分子を溶出した。溶出した PrP 分子を Mili-Q に対して透析し、0.2 μm のフィルターを通したものを最終精製物とした。

## 2) RT-Quic 法

プレートリーダーとして TECAN F200 を用いた。プレートは 96 well optical bottom plate (Thermo Fisher) を使用し、下方測定により蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 500 mM NaCl, 100 μM EDTA, 10 μM ThT および 60 μg/ml rPrP を基本とし、必要に応じて、NaCl および rPrP の濃度、および pH を変更した。また攪拌スピードは 432-218 rpm の範囲で変化させた。ThT の蛍光は励起フィルター 430 nm および吸収フィルター 485 nm で検出した。

プリオン感染脳材料として、Chandler 株感染マウス脳および 263K 株感染ハムスター脳を用いた。PBS を用いて 10<sup>-2</sup>~10<sup>-11</sup> の希釈列を作製して、50% seeding dose (SD<sub>50</sub>) を求めた。陰性対照として、age-match の非感染マウスおよび非感染ハムスター脳を用いた。

### (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 2014-1-61)。

## C. 研究結果

### 1) 攪拌スピードの影響

試験開始当初、Chandler 株および 263K 株のどちらを使用した場合でも、SD<sup>50</sup> が 10<sup>-5</sup>~10<sup>-6</sup> 程度の感度しか得られず、目標とする感度を得ることができなかった。後日、プレートリーダーの初

期不良による攪拌スピードが設定値の 432rpm に達しておらず、実際には 218rpm で作動していることが判明し、攪拌スピードの不足が感度が低い原因と考えられた。

プレートリーダーを交換して、攪拌スピードの動作確認を行い、改めて rMoPrP を基質、Chandler 株を seed として RT-Quic 法を実施したところ、no-seed あるは非感染マウス脳乳剤で spontaneous な ThT 値の上昇が認められた。そこで、反応条件を精査した結果、rMoPrP を使用する場合、60 μg/ml rMoPrP, 500 mM NaCl, 25 mM PIPES (pH 6.5), 100 μM EDTA, 10 μM ThT, 攪拌スピード 336 rpm の条件で、spontaneous な非特異反応が生じずに、SD<sub>50</sub> が 10<sup>-8.2</sup> と良好な感度が得られた (図 1)。同様に rHaPrP を使用する場合の至適反応条件を検討した結果、60 μg/ml rHaPrP, 300 mM NaCl, 25 mM PIPES (pH 7.0), 100 μM EDTA, 10 μM ThT, 攪拌スピード 432 rpm の条件で、spontaneous な非特異反応が生じずに、SD<sub>50</sub> が 10<sup>-8.5</sup> と良好な感度が得られた (図 1)。

今回設定した至適反応条件で、L-BSE (BSE-JP24)、C-BSE-TE (BSE-JP2)、および C-BSE-WA (BSE-JP6) を seed とした時の感度は SD<sub>50</sub> が 10<sup>-5</sup>~10<sup>-7</sup> であった。また、同条件下で、BSE スクリーニング 1 次検査で陽性もしくは擬陽性と判定され、確認検査で陰性と確定した 5 検体を調べたが、全て陰性と判定された。

## D. 考察

偶発的な導入器機の初期不良に対応する過程で、RT-Quic 法の感度と精度を左右する因子の一つが攪拌スピードであることが改めて確認された。Chandler 株および 263K 株に関しては、論文等で報告がある検出感度に近い感度が得られた。しかし、実施機関間で同等の検出感度で試験を実施するためには、seed の標準品による精度管理が必要と考えられる。

特に、L 型非定型 BSE を seed とした場合、RT-Quic の原法を開発した長崎大学の検出感度よりも 10<sup>2</sup> 程度検出感度が低かった。長崎大学では、L-BSE 実験感染牛の脳から調整した脳乳剤を使用しており、我々は日本で摘発された L-BSE (BSE-JP24) の検査材料であった延髄から調整した脳乳剤を使用している。この差を明らかにするためにも、seed の標準品を用いた、検出感度の精度管理は重要な課題である。

## E. 結論

RT-Quic 法の技術移転が終了し、ウシ検査材料を用いる RT-Quic 法の実施が可能となった。来年度は、高齢牛を対象に潜在的な非定型 BSE の調査を進める。

## [参考文献]

- 6) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*, 17: 175-178, 2010.
- 7) Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog*, 6: e1001217, 2010.

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 6) 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.
- 7) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, Pentosan polysulfate, chlorpromazine and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLoS One*, 9 (9): e106516, 2014.
- 8) Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 454: 125-130,

2014.

- 9) Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh TT, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y. Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J Vet Med Sci*, 76: 1001-1008, 2014
- 10) 堀内 基広 BSE の発生とその対策を振り返って 日本獣医師会雑誌 67: 345-353, 2014.

### 2. 学会発表

- 5) Fujiwara A, Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi, M. Analysis of prion infection in primary cortical neurons. Prion2014, Trieste, Italy, May 27-30, 2014.
- 6) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of mechanism for PrPSc-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody mAb132. Prion2014, Trieste, Italy, May 27-30, 2014.
- 7) Hasebe R, Sakai K, Song C-H, Takahashi Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi, M. Involvement of CD14 in neuropathogenesis of prion diseases. APPS2014, Cheju, Korea, July 6-7, 2014.
- 8) Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi, M. High throughput detection of PrPSc from prion-infected cells without PK-treatment: cell-based ELISA for novel screening method for anti-prion compounds. APPS2014, Cheju, Korea, July 6-7, 2014.
- 9) 堀内 基広、斉藤 真央、長谷部 理絵、山崎 剛士 プリオン増殖に関わる細胞内小器官の同定-プリオン感染マウス脳組織の免疫組織学的解析から- 2014年11月10-12日 パシフィコ横浜、横浜
- 10) 山崎 剛士、鈴木 章夫、長谷部 理絵、堀内 基広 フローサイトメトリーによるプリオン感染細胞の検出 2014年11月10-12日 パシフィコ横浜、横浜
- 11) 藤原 愛、山崎 剛士、鈴木 章夫、長谷部 理絵、堀内 基広 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 第157回日本獣医学会 2014年9月9-11日、北海道大学、札幌
- 12) 黒田 弥乃梨、山崎 剛士、鈴木 章夫、長谷部 理恵、堀内 基広 プリオン感染マウス

脳由来アストロサイトの活性化状態の解析  
第 157 回日本獣医学会 2014 年 9 月 9-11 日、  
北海道大学、札幌

13)

14)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況