

【原 著】

マウスの神経、副腎、リンパ組織、消化管、および筋肉における正常プリオン蛋白の分布についての免疫組織化学的研究

村林 宏* 関川 三男** 古岡 秀文*** 大森 行雄*

【要 旨】

本研究では、プリオン蛋白 (prion protein: PrP) の体内感染経路を検討するために、4種類の PrP (AB5058、B103、SAF32、8G8) 抗体を用いて正常マウスの大脳、副腎、脾臓、消化管、筋肉組織で免疫染色を行い PrP の局在を調べた。また、各抗体の至適条件を検索した。その結果、免疫染色の前処理として組織のオートクレーブ処理が不可欠であった。また、4種類の PrP 抗体では、B103 は中枢と末梢神経でよく反応し、SAF32 は末梢神経とリンパ系でよく反応した。マウスの大脳では、PrP 免疫活性が多く神経細胞とその短い神経突起に見られた。副腎では、PrP 免疫活性は髄質の多くのクロマフィン細胞と多数の神経線維に認められたが、皮質では認められなかった。脾臓では、PrP 免疫活性が胚小節内の樹状細胞に強く認められた。消化管では、PrP 免疫活性が平滑筋層内の神経細胞および神経線維に、また、粘膜上皮中のセロトニン免疫陽性細胞にも認められた。また消化管内のリンパ節では、PrP 免疫活性が樹状細胞に強く認められた。舌筋、腹筋、心筋では、PrP の免疫活性が神経線維に認められた。これらの事実は、PrP の体内感染経路の可能性として、神経行性もしくは血行性があることを示唆するものである。

【キーワード】 プリオン蛋白、マウス、神経、リンパ組織、副腎

I. 緒 言

ウシの海綿状脳症 (Bovine spongiform encephalopathy: BSE)、羊のスクレーピー、ヒトのクロイツフェルトーヤコブ病など種々の呼び名で呼ばれている海綿状脳症は、いずれも正常プリオン蛋白が異常プリオン蛋白に変化することによって起こるものと考えられている¹⁾。これまでに、このような疾病に罹患した動物では、異常プリオン蛋白が中枢神経に高濃度に集積していたことが免疫組織化学的研究によって報告されている^{2,3,4,5)}。また海綿状脳症発症にはリンパ系組織が重要な役割を果たしている事も知られている^{6,7)}。さらにプリオン蛋白遺伝子をノックアウトマウスでの実験から、正常プリオン蛋白が存在しないと異常プリオン蛋白も伝染しないことが明らかにされている⁸⁾。しかしながら、異常プリオン蛋白が消化管を経て中枢神経系に到達するまでの体内感染経路についてはまだ良く分かっていない。

そこで本研究では、マウスの神経、筋肉、内分泌およびリンパ系組織でプリオン蛋白抗体を用いて各組織における正常プリオン蛋白の局在を免疫組織化学的に調べ、体内感染経路の可能性について検討した。さらに本研究では、これまでに報告されてきたプリオン抗体の免疫染色法のうち免疫組織化学染色の前処理として Proteinase K 処理とオートクレーブ処理についても染色性の検討を加えた。

II. 材料と方法

動物は 11 例のマウス (male, ddY, 8 week old, Japan SLC, Japan) を用いた。マウスはジエチルエーテルで麻酔後、生理食塩水で心灌流にて放血、80ml の 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 (4% PFA, 7 例) もしくは 10% ホルマリン溶液 (10% FA, 4 例) で灌流固定をした後、同溶液で 4℃、一晚浸漬させた。4% PFA 固定標本お

* 日本赤十字北海道看護大学 形態機能学 ** 帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門 食品衛生学分野 *** 同 基礎獣医学研究部門 病態予防学分野

よび10%FA固定標本から1例ずつ、パラフィン包埋に用い、残りの4%PFA固定標本6例と10%FA固定標本3例は凍結標本作成に用いた。本研究での動物実験は、日本赤十字北海道看護大学動物実験委員会の認可を経て実施した。

本研究で使用した組織は脳、脊髄神経節（凍結標本のみ）、副腎、脾臓、回腸、骨格筋（腹筋、舌）、心筋で、固定済み組織を流水洗、エタノール脱水、キシレン透徹した後、パラフィン包埋し、4 μ mの切片を作製した。また、凍結切片のために固定済み標本をPBSで洗浄後、30%スクロース・PBS溶液に一晩浸漬させて組織を凍結包埋させ、Cryostat (CM3050, Leica, Germany)で12 μ mの切片を作製した。

免疫組織化学的染色を行なうため、パラフィン切片は脱パラフィン後、流水洗浄、PBS洗浄した。凍結切片はPBS洗浄した。パラフィン切片、凍結切片は蒸留水に浸漬させオートクレーブ(121 $^{\circ}$ C、20分)で抗原賦活化処理を行なった。また、抗原賦活化処理を行なわない群は蒸留水に浸漬させ放置した。一部の切片はProteinase K(4 μ g/100ml, 9033, TAKARA BIO, Japan)で5分処理し、PBSで洗浄した。その後、各切片を3%過酸化水素で10分浸漬し、PBS洗浄後、goat anti-prion protein antibody (AB5058:蛋白認識部位79-97のアミノ酸1:200-4000, Chemicon International Inc. El Segundo, CA, USA), rabbit anti prion antibody (B103抗体, 蛋白認識部位103-121のアミノ酸, 1:1000, Fuji Rebio, Tokyo), mouse anti scrapie associated fibrils 32 antibody (SAF32抗体, 蛋白認識部位52-92のアミノ酸1:1000, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), mouse anti-prion protein antibody (8G8:蛋白認識部位95-110のアミノ酸, 1:200-2000, Cayman Chemical Company)を滴下して4 $^{\circ}$ C、一晩反応させた。切片をPBS洗浄後、biotin-conjugated anti-rabbit serum (BA1000, Vector Laboratories, Stillwater, CA, USA)、biotin-conjugated anti-mouse serum (BA2000, Vector Laboratories)、もしくはbiotin-conjugated anti-goat serum (BA9500, Vector Laboratories)で1時間反応させた。PBS洗浄後、avidin-biotin-complex (ABC液; PK-6100, Vector Laboratories)で1時間反応させ、PBS洗浄後、diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dojin, Japan)で3-20分間反応させた。反応後、PBS洗浄し、カバーガラスで封入した。標本は光学顕微鏡(Axioplan2, Leica, Germany)で観察、写真撮影した。なお、回腸標

本に関してはSAF32抗体とrabbit serotonin antibody (セロトニン抗体, No.20064, DiaSorin, MN, USA)を混和した希釈液を滴下して4 $^{\circ}$ C、一晩反応させ、PBS洗浄後、cyanine-conjugated anti rabbit serum (711-225-152, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)およびindocarbocyanine-conjugated anti mouse serum (715-165-151, Jackson Immuno Research)の混和液で1時間反応させPBS洗浄後カバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡(filter No.10 and No.20)で観察、写真撮影した。

また、normal rabbit serum (1 μ g/ml, I-1000, Vector Laboratories)およびnormal mouse serum (1 μ g/ml, I-2000, Vector Laboratories)を一次抗体の代わりに反応させた群を陰性コントロールとして用いた。

III. 結 果

今回の免疫染色では、マウスの組織で調べる事から染色再現性を明確にするために、過去のプリオン抗体の染色法に検討を加え、最もよく免疫染色が行なえる条件を調べた。その結果、組織切片の免疫染色に伴う、前処理として通常行なわれているオートクレーブ処理はプリオン抗体の免疫染色に不可欠な要素であったが(図1a,b)、Proteinase K処理はほとんど染色を増強する効果がなかった。

プリオン抗体についても今回は、AB5058、B103、SAF32と8G8の抗体が免疫染色に試された。その結果、AB5058抗体と8G8抗体は染まりが悪く、B103とSAF32抗体が染色に使われた。そのうちB103抗体では中枢および末梢神経でよく反応を示した。一方、SAF32抗体では、中枢神経では反応が

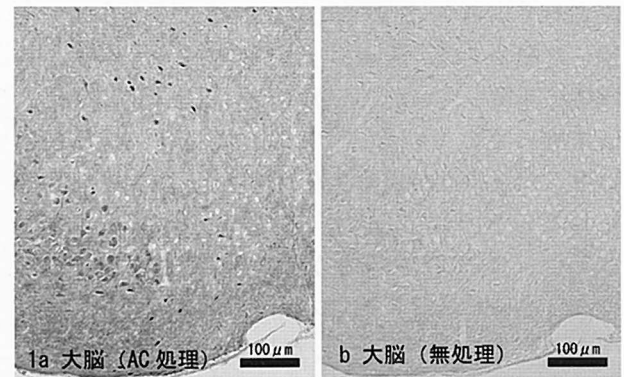


図1a, b B103抗体を用いたマウス大脳の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。a) オートクレーブ(AC)処理。正常プリオン蛋白免疫活性を示す多くの神経細胞。b) AC無処理。aで用いた切片の連続切片。免疫活性は見られない。

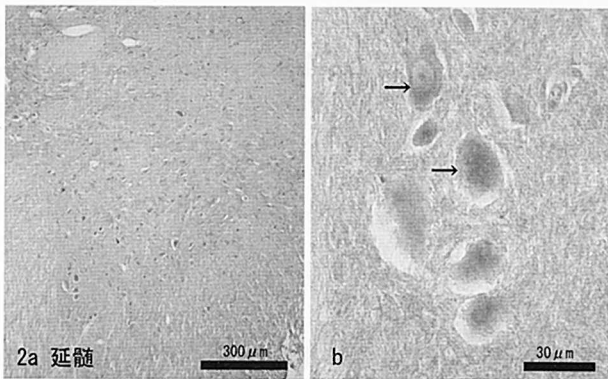


図2a, b B 103 抗体を用いたマウス延髄の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。a) 正常プリオン蛋白免疫活性を示す多くの神経細胞。b) aの一部拡大。正常プリオン蛋白免疫活性が神経細胞の細胞質(矢印)に見られる。

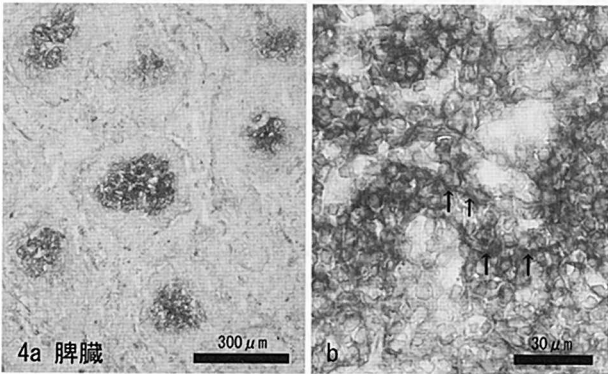


図4a, b SAF 32 抗体を用いたマウス脾臓の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。a) 正常プリオン蛋白免疫活性が散在した胚小節内に認められる。b) aの一部拡大。正常プリオン蛋白免疫活性が胚小節内の樹状細網細胞の突起(矢印)に見られる。

弱く、末梢神経では明確に反応していた。またこの抗体では脾臓やパイエル板などのリンパ系組織でも反応が見られた。

大脳、延髄では、B103 抗体によって正常プリオン蛋白免疫陽性反応が多くの神経細胞体および短い神経突起に強く認められた(図 2a,b)。また一部の長い神経突起にも時々正常プリオン蛋白の免疫活性が認められた。しかしながら多くの神経線維にはその免疫活性があまり見られなかった。SAF32 抗体では大脳の神経細胞、神経線維ともほとんど免疫活性が見られなかった。

副腎では、B103 と SAF32 の抗体で副腎髄質全体のほとんどのクロマフィン細胞に強く正常プリオン蛋白の免疫活性が観察された(図 3a,b)。また副腎髄質内では、正常プリオン蛋白免疫陽性の神経線維が

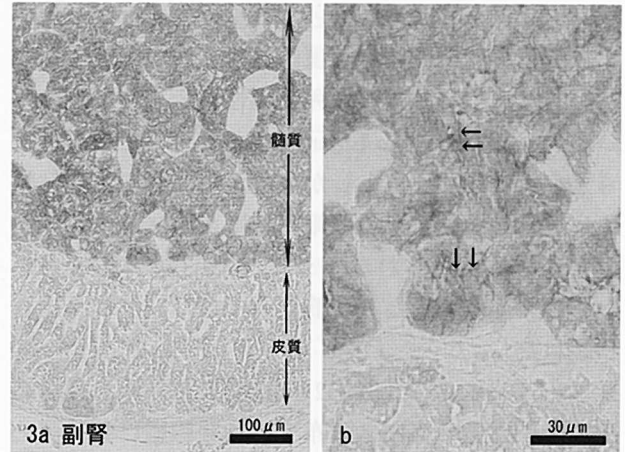


図3a, b B 103 抗体を用いたマウス副腎の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。a) 正常プリオン蛋白免疫活性が皮質には見られないが、髄質全体に認められる。b) aの一部拡大。正常プリオン蛋白免疫活性が多くのクロマフィン細胞と神経線維(矢印)に見られる。

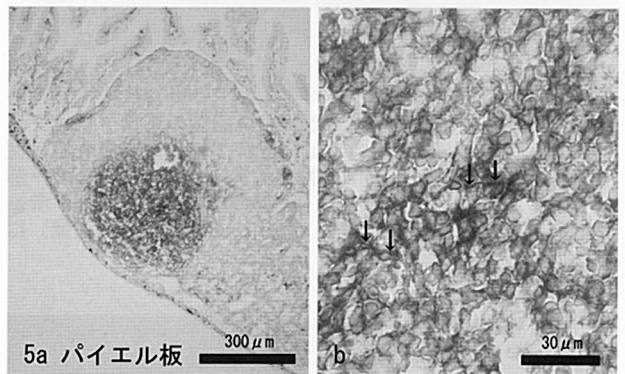


図5a, b SAF 32 抗体を用いたマウス回腸パイエル板の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。a) 正常プリオン蛋白免疫活性がパイエル板内部に丸く認められる。b) aの一部拡大。正常プリオン蛋白免疫活性がパイエル板内部の樹状細網細胞の突起(矢印)に見られる。

クロマフィン細胞の間に認められた(図 3a,b)。しかしながら、副腎皮質の皮質細胞では正常プリオン蛋白の免疫活性は認められなかった(図 3a,b)。

脾臓では、B103 と SAF32 の抗体で脾臓胚小節内の島状に点在する部位に強い正常プリオン蛋白免疫活性を示した。その強い免疫活性は、長い突起をもつ樹状の細網細胞に認められた。(図 4a,b)。

消化管の小腸回腸部の集合リンパ小節(パイエル板)では、B103 と SAF32 の抗体で樹状の突起をもつ細網細胞に強い正常プリオン蛋白の免疫反応が認められた(図 5a,b)。SAF32 抗体を使用した場合、回腸の平滑筋層で筋層内の神経細胞ならびに神経線維に強い正常プリオン蛋白の免疫活性が認められた(図 6a,b)。さらに回腸粘膜上皮中の一部の消化管内分泌細胞に強い正常プリオン蛋白の免疫活性が見ら

れた(図7)。免疫蛍光染色の二重染色を行なった結果、それら正常プリオン蛋白免疫陽性の内分泌細胞は同時にセロトニンにも免疫陽性を示した事からセロトニンを分泌する Enterochromaffin (EC) 細胞と考えられた(図8a,b)。しかしながら回腸の他の粘膜上皮細胞ならびに平滑筋細胞には正常プリオン蛋白の免疫活性は見られなかった。B103 抗体を使用した場合、回腸粘膜と平滑筋に若干のバックグランドが現れた。

舌では、B103 と SAF32 の抗体でプリオン蛋白の免疫活性は舌の筋肉に分布する神経線維に強く認められた(図9)。舌の横紋筋組織にはプリオン蛋白の

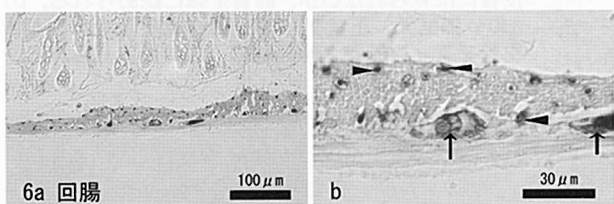


図6a, b SAF 32 抗体を用いたマウス回腸の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。a) 正常プリオン蛋白免疫活性が回腸の平滑筋層の神経に見られる。b) 図aの一部拡大。正常プリオン蛋白免疫活性が回腸の平滑筋層の多くの神経細胞(矢印)と神経線維(矢頭)に認められる。

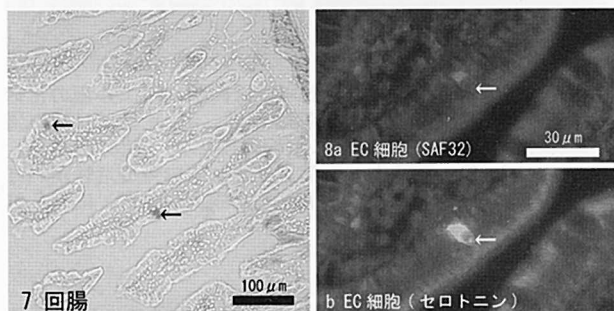


図7 SAF 32 抗体を用いたマウス回腸の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。正常プリオン蛋白免疫活性が回腸の粘膜上皮中の消化管内分泌細胞(矢印)に認められる。
図8a, b SAF 32 抗体とセロトニン抗体を用いたマウス回腸の蛍光二重免疫組織化学。正常プリオン蛋白(a)とセロトニン免疫活性(b)が同一の内分泌細胞(矢印)に見られる。

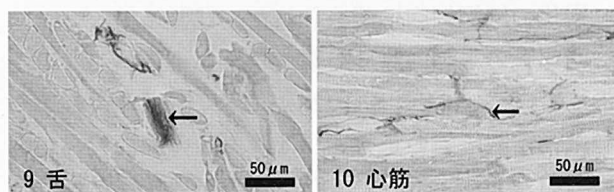


図9 SAF 32 抗体を用いたマウス舌の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。正常プリオン蛋白免疫活性が舌の筋肉内の神経線維に認められる。
図10 SAF 32 抗体を用いたマウス心筋の正常プリオン蛋白の免疫組織化学。正常プリオン蛋白免疫活性が心筋の中の神経線維に認められる。

免疫活性は認められなかった。腹筋では、舌と同様に横紋筋に分布する神経線維に強いプリオン蛋白の免疫活性が見られたが、筋細胞には観察されなかった。心臓では、心筋に分布する神経線維にプリオン蛋白の免疫活性が認められたが、心筋細胞そのものにはプリオン蛋白の免疫活性には見られなかった(図10)。

IV. 考 察

本研究では、マウスの組織を用いて免疫組織化学的に正常プリオン蛋白の局在を調べるために、抗体の染色性比較、免疫染色の前処理で行なわれる Proteinase K やオートクレーブ処理比較について検討を行なった。その結果、抗体では B103 と SAF32 抗体がマウスの組織でよく染まることが分かった。しかしながら両抗体では B103 が中枢神経から末梢組織まで染色することができたが、SAF32 抗体では中枢神経組織ではほとんど染色されず、末梢組織ではよく染まり、抗体の染色性が異なっていた。この理由はまだ分かっていないが、B103 抗体はプリオン蛋白のアミノ鎖 103-121 を認識し、SAF32 はプリオン蛋白のアミノ鎖 52-92 を認識するため、それぞれの抗体の認識部位の違いが染色の差に現れた可能性がある。免疫染色の前にオートクレーブ処理を行なった切片と処理無しの切片では、明らかにオートクレーブ処理を行った方が強いプリオン蛋白の免疫活性が認められた。このことはオートクレーブ処理の加熱によってプリオン蛋白がより露出することによって染色増強が起こっているものと思われる。一方、免疫染色の前に行なう Proteinase K の処理については、この処理を行なった場合と行なわない場合と比較したが、その差はほとんど無かった。したがって、通常プリオン蛋白の免疫染色ではオートクレーブ前処理が必須条件であると思われる。

本研究では、大脳と延髄の正常プリオン蛋白の免疫活性は、おもに神経細胞体と短い神経突起に見られた。過去の報告も同様に正常プリオン蛋白が神経細胞と神経突起に存在していた事を報告されている^{9,10)}。このことから、中枢神経では正常プリオン蛋白は細胞体や神経突起に多く局在しているものと考えられる。一方、本研究では、消化管平滑筋、心筋、舌筋、腹筋等の筋組織中では、その末梢神経細胞とその線維に強い正常プリオン蛋白の免疫活性が認められた。これらのことから、正常プリオン蛋白

が、中枢神経とは異なり、末梢神経系では細胞体ばかりでなく、多くの神経線維にも存在すると考えられる。正常プリオン蛋白は、恐らく神経細胞体で作られ、その後神経突起あるいは軸索末端まで軸索流によって、他の蛋白同様に、運ばれていくものと考えられるが、中枢神経と末梢神経では正常プリオン蛋白の運搬に違いが有る可能性が示唆される。

これまでにプリオン病では、異常プリオン蛋白が体内感染した後、正常プリオン蛋白を異常プリオン蛋白に変換し、その異常プリオン蛋白が神経細胞に蓄積する事によって発症することが分かっている¹⁾。また、その異常プリオン蛋白への変換も、正常プリオン蛋白が存在しないと起こらないことも、正常プリオン蛋白をノックアウトしたマウスの実験から明らかになっている⁸⁾。

これまでに異常プリオン蛋白の脳への直接投与や経口あるいは腹腔投与感染実験が行なわれ、その結果、海綿脳症が発症した事が報告されている^{11,12)}。また過去の研究では、異常プリオン蛋白あるいは正常プリオン蛋白が消化管リンパ性組織（扁桃やパイエル板、リンパ節）や脾臓に存在する事も報告されている¹³⁾。我々の研究でも、マウスの消化管のパイエル板やリンパ節、そして脾臓においても、樹状細胞に正常プリオン蛋白の免疫活性が認められた。一般的に蛋白のような大きな分子量は直接腸の吸収上皮細胞から吸収されることは無く、消化酵素などの作用を受けてアミノ酸にまで分解された後、吸収されることが知られている¹⁴⁾。また、過去の研究では、食物として消化管に入った異常プリオン蛋白が、消化管内のリンパ性組織の表層に存在する細胞、たとえばパイエル板最表層に位置するM細胞などにおける caveolae（飲小窩）によって飲作用（pinocytosis）が起こり、異常プリオン蛋白が細胞内に直接取りこまれ、その後、そのリンパ節内の樹状細胞に移り、リンパ系を介して異常プリオン蛋白が神経組織へと運ばれて伝染する可能性が示されている¹⁵⁾。この説では、末梢組織ではプリオン蛋白が血行を介して末梢組織に運ばれ、血管から組織に到達する可能性は十分考えられる。しかしながら、中枢神経組織においては、異常プリオン蛋白のような大分子量の蛋白が血行を経ていかに脳血液関門を通過して中枢神経細胞に到達できるのかについてはまだよく分かっていない。確かに脳内の大半は脳血液関門のために通過できる物質は限られているが、脳弓下器官などのように一部の脳血液関門を持たない血

管部位¹⁶⁾も脳内には有るので、そういった部位から神経細胞に到達する経路も可能性がある。また、脳内に侵入した異常プリオン蛋白は、神経細胞周囲に密なオリゴデンドログリア（希突起膠細胞）が存在する¹⁷⁾ために容易に到達する事ができない構造となっている。恐らく、中枢では血管を通過した異常プリオン蛋白は神経細胞周囲のこれら希突起膠細胞や自由に動き回るミクログリア（小膠）細胞などが異常プリオン蛋白を運搬し、神経細胞に到達する可能性が考えられる。実際、過去の研究でも異常プリオン蛋白の伝播に希突起膠細胞や小膠細胞が関連していたことが報告されている¹⁸⁾。

これらの異常プリオン蛋白の神経細胞への伝染経路については、他の可能性として神経伝達物質とともに神経から神経へと伝達される可能性、もう一つは、内分泌細胞から、ホルモン様物質として神経細胞に到達する経路が考えられる。過去の研究では、神経細胞内の正常プリオン蛋白の免疫活性が神経細胞の細胞膜や細胞質に多く、神経顆粒やミトコンドリアには少なかった事を報告されている⁹⁾。しかしながら、正常プリオン蛋白の免疫活性が神経顆粒に全く無い訳ではなく、また細胞質内の免疫活性がどのような細胞内小器官に存在するのか、まだ明確になっていない。その点に付いては、更なる詳細な研究が必要と思われる。また、今回我々はマウスの副腎髄質のクロマフィン細胞や、消化管内分泌細胞のセロトニン陽性のEC細胞に正常プリオン蛋白の免疫活性を認めた。過去の研究でも消化管内分泌細胞の一部に、正常プリオン蛋白の免疫活性があったという報告がある¹⁹⁾。このことから、正常プリオン蛋白が副腎髄質のクロマフィン細胞ではカテコールアミンとともに、そして消化管内分泌細胞のEC細胞ではセロトニンとともに血中に放出され、血行を介して目的細胞に到達する可能性があると思われる。今後はこれら神経および内分泌細胞における正常プリオン蛋白の細胞内局在を調べ、正常プリオン蛋白が分泌顆粒内に存在するかどうかを明らかにする必要がある。

V. 結 論

本研究では B103 および SAF32 抗体の有用性とオートクレーブの必要性が確認された。また、これら抗体を用いた免疫染色により、PrP は中枢神経細胞、末梢神経細胞および線維、リンパ系の樹状細胞

胞、副腎および小腸粘膜の内分泌細胞に存在することが証明された。これらの事実は、PrPの体内感染経路の可能性として、神経行性もしくは血行性があることを示唆するものである。

VI. 引用文献

- 1) Prusiner SB: Molecular biology of prions causing infectious and genetic encephalopathies of humans as well as scrapie of sheep and BSE of cattle. *Dev Biol Stand.* 75:55-74, 1991.
- 2) Haritani M, Spencer YI, Wells GAH: Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol.* 87:86-90, 1994.
- 3) Ryder SJ, Hawkins SAG, Dawson M, Wells GAH: The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J. Comp. Path.* 122:131-143, 2000.
- 4) Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, March SA: Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec.* 148:7-13, 2001.
- 5) Liu WG, Brown DA, Fraser JR: Immunohistochemical comparison of anti-prion protein (PrP) antibodies in the CNS of mice infected with scrapie. *J Histochem Cytochem.* 51:1065-1071, 2003.
- 6) Thielen C, Melot F, Jolois O, Leclercq F, Tsunoda R, Frobert Y, Jeinen E, Antoine N: Isolation of bovine follicular dendritic cells allows the demonstration of a particular cellular prion protein. *Cell Tissue Res.* 306:49-55, 2001.
- 7) Brown KL, Ritchie DL, McBride PA, Bruce ME: Detection of PrP in extraneural tissues. *Microsc Res Tech.* 50:40-45, 2000.
- 8) Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582, 1992.
- 9) Mironov A, Latawiec D, Wille H, Bouzamond-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ: Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci.* 23:7183-7193, 2003.
- 10) Kovacs GG, Preusser M, Strohschneider M, Budka H: Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain. *Am J Path.* 166:287-294, 2005.
- 11) Kimberlin RH, Walker CA: Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res.* 12:213-220, 1989.
- 12) Beekes M, McBride PA: Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosc Let.* 278:181-184, 2000.
- 13) Monleon E, Monzon M, Hortells P, Vargas A, Acin C, Badiola JJ: Detection of PrPsc on lymphoid tissues from naturally affected scrapie animals: comparison of three visualization systems. *J Histochem Cytochem.* 52:145-151, 2004.
- 14) 星 猛、林 秀生、菅野富夫、中村嘉男、佐藤昭夫、熊田 衛、佐藤俊秀：医科生理学展望、丸善、1998.
- 15) Mabbott NA, Bruce M: The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Viol.* 82:2307-2318, 2000.
- 16) 藤田 恒夫、藤田 尚男：標準組織学 各論、医学書院、1988.
- 17) 藤田 恒夫、藤田 尚男：標準組織学 総論、医学書院、1992.
- 18) Marella M, Chabry J: Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci.* 24:620-627, 2004.
- 19) Marcos Z, Pffefer K, Bodegas ME, Sesma MP, Guembe L: Cellular prion protein is expressed in a subset of neuroendocrine cells of rat gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem.* 52:1357-1365, 2004.

Immunohistochemical Study on the Localization of Normal Prion Protein in the Nerve, Adrenal Gland, Lymphatic Tissue, Intestine, and Skeletal Muscle of the Mouse

Hiroshi Murabayashi^{*}, Mitsuo Sekikawa^{**}
Hidefumi Furuoka^{***}, Yukio Oomori^{*}

^{*} Division of Anatomy and Physiology, Japanese Red Cross Hokkaido College of Nursing

^{**} Department of Agriculture and Life Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

^{***} Laboratory of Infectious Pathology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

[Abstract]

For the aim of investigating the internal route of infection of prion proteins (PrP), this study examined the localizations of PrP in normal mouse organs (cerebrum, adrenal gland, spleen, intestine, and muscle tissues) by immunohistochemical method using four specific antisera (AB5058, B103, SAF32, and 8G8). Optimum conditions for these antisera were also examined. It was revealed that the autoclave treatment of the tissues was necessary for this immunohistochemical process. B103 antisera showed immunoreactivities in the central and peripheral nerve tissues, while SAF32 showed immunoreactivities in the peripheral nerve tissues and in the lymphoid tissues. In the cerebrum, the PrP immunoreactivities were seen in numerous neuronal cells and in the short nerve processes. In the adrenal gland, PrP immunoreactivities were recognized in numerous chromaffin cells and nerve fibers in the medulla, but not in the cortex. The PrP-immunoreactive follicular dendritic cells were localized in the lymphatic nodule of the spleen. In the digestive tract, PrP immunoreactivities were seen in the neuronal cells and nerve fibers in the muscular layer, and in the serotonin-immunoreactive endocrine cells in the mucosal epithelium. Moreover, the strong PrP immunoreactivities were seen in the follicular dendritic cells in the intestinal lymph node. The PrP-immunoreactive nerve fibers were recognized in the skeletal muscle of tongue and abdomen and myocardium. These facts suggest the possibilities that the PrP presumably were infected by way of nerves and or blood vessels.