

## 【研究紹介】

# 脳内接種による BSE 感染牛の異常プリオンタンパク質の分布

福田 茂夫

北海道立総合研究機構畜産試験場基盤研究部生物工学グループ  
(〒081-0038 上川郡新得町新得西5線39番地1)

## 1. はじめに

2001年、BSEの国内発生を受け、北海道立畜産試験場（現 北海道立総合研究機構 畜産試験場）は、牛海綿状脳症（BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy）の早期診断と病理発生の解明に向け、BSEの研究に着手した。BSE患畜の同居牛を発生農場から導入し、観察することから研究は始まった。また研究体制を強化するため、獣医師研究職員を1名採用することとなった。当時、私は酪農学園大学大学院博士課程に在籍し、子牛の感染防御機能に関する研究に携わっていた。課程の途中であったが、畜産に関する研究機関で牛の研究を長く続けられるまたとない機会であり、採用試験に応募したところ、縁があって2002年4月から畜産試験場の研究職員となった。

プリオンは、細菌やウイルスの感染症と異なり、核酸を持たないためPCR等の高感度検出法は使えない。BSEの診断には脳幹部の組織が必要であり、と殺前にBSE患畜を発見することは困難であった。農場段階で生きているBSE患畜を発見し、症状を観察したり血液を採取したりすることも不可能であった。BSEプリオンは、マウスや羊などの異種動物にも感染するが、動物ごとに病理発生が異なる。BSEの早期診断技術の開発や病理発生の解明には、BSEプリオンに感染した牛を用いる必要があった。畜産試験場では、農林水産省および厚生労働省のプロジェクト研究に参画し、脳内接種によるBSE感染牛を用いた研究を行うこととなった。2004年、BSE隔離試験牛舎を設置して、牛へのBSEの感染実験を開始した。

BSEの発生から現在まで、「食の安全」に関しては、依然消費者の高い関心が向けられているが、BSEにつ

いては、これまでリスク解析やリスク管理の徹底によりOIEステータス「リスクを無視できる」国に承認されるなど終息状況となった。この間、一般社会情勢は、政権交代や東日本大震災など大きく変化した。畜産試験場も、道立の研究機関から地方独立行政法人の機関となり、配置変更やグループ改変もされてきた中、この13年間、一貫してBSE研究に専念できる環境を与えて頂いた。研究予算や共同研究相手にも恵まれ、BSEの研究を続けることができた。これまでの研究成果をまとめた論文を北海道大学に提出し、2013年12月に博士（獣医学）の学位を授与された。今回は、これまでの研究の中から脳内接種によるBSE感染牛の異常プリオンタンパク質の分布に関する研究について紹介する。

## 2. 脳内接種による BSE 実験感染牛の異常プリオンタンパク質の分布

**背景・目的：**伝達性海綿状脳症（TSEs: Transmissible Spongiform Encephalopathies）は、中枢神経組織における空胞病変と異常プリオンタンパク質の蓄積を特徴とする致死性神経疾患で、プリオン病と呼ばれ、牛のBSE、羊のスクレイピー、鹿の慢性消耗症や人のクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）などが知られている。BSEは、人の変異型CJDの原因と考えられおり、畜産物を介した人獣共通感染症として公衆衛生上の重要な疾病である。1986年、英国で初めて確認され、その後、ヨーロッパ、アジアおよび北米に広がった。英国で発生して世界各地に広がったBSEは定型BSE（C-BSE）と呼ばれている。我が国では、2001年9月に初めてBSEが確認され、現在までに36例のBSE患畜が見つかっているが、2009年3月を最後に確認されていない。また2013年には国際獣疫事務局（OIE）のBSEリスクステータス「無視でき

連絡責任者：福田 茂夫 道総研畜産試験場基盤研究部

TEL: (0156) 64-0618 FAX: (0156) 64-3484 E-mail: fukuda-shigeo@hro.or.jp

る BSE リスク」の国の承認を得たところである。牛を用いた BSE 感染試験は、長い研究期間が必要なことや厳重な管理が必要であるなどの制約が多く、通常の施設では実施は困難である。そのため、牛における BSE の病理発生や牛や人への伝播リスクを評価するための BSE プリオンに関する知見も十分でなかった。BSE 感染牛における PrP<sup>Sc</sup> の脳内分布は、経口感染実験牛および野外発生例で報告されている。しかしながら、中枢神経への PrP<sup>Sc</sup> の沈着と臨床経過との関連は、未だ明らかでない。本研究では C-BSE を脳内接種した牛の PrP<sup>Sc</sup> 脳内分布を免疫組織化学および WB 法により解析し、臨床経過との関連性について検討した。

**方法：**3頭の BSE 患者 (①英国 BSE 患者 (BSE/UK)、②国内5例目 (BSE/JP5)、③国内6例目 (BSE/JP6)) の脳組織から調整した10%脳乳剤を接種材料とした。

BSE 感染試験は、16頭の生後約3カ月齢のホルスタイン種子牛を用いた。各供試牛は麻酔処置し、直径2mmのピンドリルで前頭骨右側を貫通し、その貫通穴より18Gのカテラン針を用いて中脳を標的に穿刺し、前述の10%BSE感染脳乳剤1mlを脳内接種した。術後はBSE隔離牛舎にて飼養し、経過観察を行った。供試牛のうち、7頭は臨床症状が現れる前に、9頭は臨床症状を確認した後病理解剖した<表1>。

病理解剖時に大脳、小脳および脳幹部、脊髄胸膨大、脊髄腰膨大部を採取した。ウエスタンブロット (WB)

法による PrP<sup>Sc</sup> 検出のための組織は-80℃で保管した。病理組織学的解析 (HE 染色) または免疫組織化学的解析のための組織は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、98%ギ酸によりプリオン不活化処理した。病理組織学的解析では、各部位の HE 染色標本を観察し、脳の空胞変性の分布を、次のようにスコア化した (0:ネガティブ、1:対物×10の視野下で、空胞数が3個以下、2:対物×10の視野下で、数個の空胞が散在、3:対物×10の視野下で、多数の空胞が散在、4:対物×10の視野下で、無数の空胞が散在し、空胞同士の融合も見られる)。免疫組織化学的解析では、パラフィン包埋組織切片を抗 PrP モノクローナル抗体 T1 で標識し、沈着した PrP<sup>Sc</sup> を検出した。PrP<sup>Sc</sup> は以下の8つのタイプに分類した。細胞内 PrP<sup>Sc</sup> は、神経細胞内とグリア内の顆粒状沈着の2つ、網状組織における細胞外 PrP<sup>Sc</sup> の沈着は、線形、ニューロン周囲、微粒子状、粗い粒子状および結合体の6つに分類した。PrP<sup>Sc</sup> の蓄積スコアは、IHC 標本の顕微鏡下の観察により、次のように評価した (0:PrP<sup>Sc</sup> を認めない、1:強拡大視野で PrP<sup>Sc</sup> を認める、2:中拡大視野で PrP<sup>Sc</sup> を認める、3:弱拡大視野で PrP<sup>Sc</sup> を認め、中程度の蓄積がある、4:著しい PrP<sup>Sc</sup> の蓄積がある)。

WB 法は脳の18箇所と脊髄2箇所を解析した。脳の各部位を用いて10%脳乳剤をプロテアーゼ K (反応濃度 40 μg/ml) で消化処理した。ブタノール・メタノール

表1 定型 BSE 脳内接種牛の臨床症状と病態の変化

Case	Code	接種材料	接種から症状確認まで(月)	発症時の臨床症状	終末期の臨床症状	接種から解剖まで(月)	空胞変性	PrP <sup>Sc</sup> by IHC	PrP <sup>Sc</sup> by WB
1	0801	BSE/UK	-	-	-	3	-	-	-
2	9066	BSE/UK	-	-	-	10	-	+	+
3	9385	BSE/UK	-	-	-	12	-	+	+
4	3962	BSE/JP6	-	-	-	12	-	+	+
5	2601	BSE/UK	-	-	-	16	+	+	+
6	886	BSE/UK	-	-	-	18	+	+	+
7	3955	BSE/JP6	-	-	-	19	+	+	+
8	4394	BSE/UK	18	異常歩様	姿勢の異常	20	+	+	+
9	3728	BSE/JP5	19	神経質	運動失調	21	+	+	+
10	5426	BSE/JP5	21	運動失調	起立不能	22	+	+	+
11	5523	BSE/JP6	19	神経質	運動失調	23	+	+	+
12	4437	BSE/UK	18	運動失調	起立不能	23	+	+	+
13	1479	BSE/JP5	20	異常歩様	起立不能	23	+	+	+
14	5087	BSE/UK	19	異常歩様	運動失調	24	+	+	+
15	3217	BSE/JP5	22	異常歩様	運動失調	24	+	+	+
16	4612	BSE/JP6	22	姿勢の異常	姿勢の異常	24	+	+	+

混合液を添加後、遠心分離して得られた沈殿画分を測定サンプルとした。アクリルアミドゲルを用い1レーン5 mg 組織等量で電気泳動し、メンブレンに転写後、HRP 標識 T2マウスモノクローナル抗体を用い、化学発光により PrP<sup>Sc</sup> の検出を行った。陽性対照として、マウススクレイピー (1.6および6.4 μg 組織当量) を用い、発光強度の比較を行った。

**結果:** 16頭のうち、未発症期に解剖した7頭 (Case 1~7) を除く、9頭 (Case 8~16) に接種後18カ月から22カ月 (平均19.7±1.6カ月) で、BSE の臨床症状が出現した。これらの初期の臨床症状は、頭を低く下げる、神経質および聴覚刺激に対する過敏反応であった。これらの臨床症状は進行性に経過し、終末期には、後駆の運動失調や起立困難となった。3つの異なる接種材料の間では、出現する臨床症状と時期に差は見られなかった。

病理組織学的解析では、脳の空胞変性の程度を前述のようにスコア化した結果を<図1>に示した。接種後3、10、12カ月で解剖した4頭 (Case 1~4) では、どの部位にも空胞変性は無かった。接種後16および18カ月で解剖した未発症の2頭 (Case 5、6) では、少数の空胞が視床、視床下部、橋、延髄に見られた。しかし、大脳皮質および小脳皮質に空胞変性病変は無かった。19カ月で解剖した未発症期の牛 (Case 7) では、脳全体に広く中程度の数の空胞が見られた。空胞は、視床、橋および中脳で明瞭であり、大脳皮質では少なかった。接種

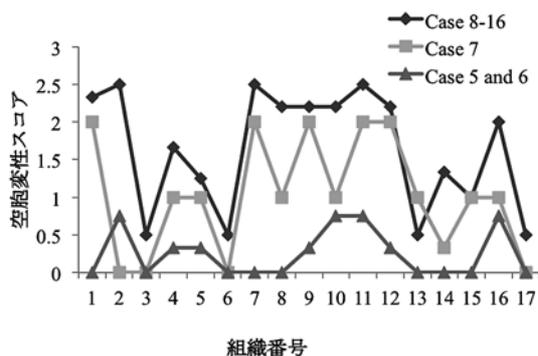


図1 脳内接種による BSE 感染牛の発症前および発症後の変性スコア

Case 5 and 6 : 接種後16および18カ月の発症前に解剖した牛の平均スコア

Case 7 : 接種後19カ月の発症前に解剖した牛のスコア

Case 8 - 16 : 接種後20~24カ月の発症後に解剖した平均スコア

組織番号 1 : 延髄孤束核、2 : 延髄三叉神経脊髄路核、3 : 舌下神経核、4 : 前庭神経核、5 : 蝸牛核、6 : 小脳虫部、7 : 小脳中心灰白質、8 : 吻側部、9 : 内側膝状核、10 : 視床下部、11 : 背内側核、12 : 中間腹側核、13 : 前頭部大脳皮質、14 : 側坐核、15 : 尾状核、16 : 被殻、17 : 前障

後20から24カ月の臨床症状が現れた牛 (Case 8~16) では、空胞変性病変は、未発症の牛に比べ増加した。視床および中脳の空胞スコアは最も高く、後頭葉の皮質や小脳皮質ではスコアは低かった。

免疫組織化学的解析による PrP<sup>Sc</sup> の分布と蓄積スコアを<図2>に示した。接種後10カ月で解剖した1頭 (Case 2) の視床、中脳、橋、延髄の神経核周部と灰白質の網状組織に、微粒子または顆粒状型、および線状型のまばらな PrP<sup>Sc</sup> の沈着が見られた。接種後12カ月で病理解剖した2頭 (Case 3、4) では、神経細胞内の微粒子または顆粒状の沈着および網状組織の微粒子または顆粒状の沈着が脊髄の灰白質によく見られた。しかし、接種後3カ月で解剖した牛 (Case 1) の脳では PrP<sup>Sc</sup> の沈着は見られなかった。接種後16または18カ月で発症前に解剖した2頭 (Case 5、6) では、視床、中脳、橋、延髄、小脳髄質における線状および結合体の沈着、神経細胞内およびグリア細胞内に中程度の量の顆粒が確認された。大脳および小脳の皮質では PrP<sup>Sc</sup> の沈着は少なく、最も少ないのは前頭部であった。接種後19カ月の



図2 免疫組織化学的解析による PrP<sup>Sc</sup> 分布の概略図

Cases 4 - 7 : 発症前に解剖した牛、Cases 8 - 16 : 発症後に解剖した牛

PrP<sup>Sc</sup> 蓄積スコア 0 : 沈着なし、1 : ごくわずか、2 : 軽度、3 : 中程度、4 : 高度の沈着

それぞれの部位は、上段 : 大脳 (前頭部、前頭部と線条体、視床と頭頂部、後頭部)、下段 : 中脳、橋、延髄、小脳および脊髄の胸膨大部 (C8) と腰膨大部 (L6)

牛 (Case 7) では、脳幹と視床に神経細胞内空胞がやや見られた。PrP<sup>Sc</sup>沈着は、脳幹、視床および中隔核、視床下部、小脳において中程度に局在しており、脊髄の灰白質および海馬でまばらであった。この牛の大脳皮質へのPrP<sup>Sc</sup>沈着は、接種後16または18カ月で解剖した2頭 (Case 5、6) より明瞭であった。臨床徴候を示した牛では、PrP<sup>Sc</sup>沈着の型と分布はほとんど同様であった (Case 8-16)。すなわち、様々な型のPrP<sup>Sc</sup>が、脳全体に広く分布していた。PrP<sup>Sc</sup>は、脳幹、視床、小脳の髄質と脊髄の灰白質に最も見られた。脊髄の頸部と腰部では、顕著なPrP<sup>Sc</sup>の高度の蓄積が見られた。微弱で中度の量のPrP<sup>Sc</sup>蓄積が、大脳および小脳皮質に分布した。

WB法の結果は<表2>に示した。WB法による解析では、接種後3カ月 (Case 1) で解剖した牛の脳からはPrP<sup>Sc</sup>は検出されなかった。接種後10カ月 (Case 2) の牛では、脳幹部および小脳より微量のPrP<sup>Sc</sup>を検出した。表2のように脳と脊髄におけるPrP<sup>Sc</sup>の蓄積は接種後の経過に従い拡大した。

考察：本試験の目的はC-BSEプリオンを脳内接種した

牛の脳におけるPrP<sup>Sc</sup>の蓄積を明らかにすることである。経口的にプリオンを摂取すると考えられる自然感染の感染経路とは異なるが、脳内接種は、牛のC-BSEの病理変化を誘発するための最も効率的な方法であると思われる。本試験におけるC-BSE感染牛の潜伏期と発症期間は、これまでの海外での報告と一致していた。

また接種後10カ月C-BSE感染牛の脳幹部より初期のPrP<sup>Sc</sup>蓄積を検出した。このことは、脳幹部が脳内接種の経路であったためか、C-BSEプリオンの標的部位であるためと考えられる。脳幹に検出されたPrP<sup>Sc</sup>は、接種材料の残りであるとも考えられたが、PrP<sup>Sc</sup>は、接種後3カ月で解析した牛の脳幹部からWB法または免疫組織化学では検出されなかった。

空胞病変分布に加えて、本試験で臨床経過の明らかなBSE感染牛におけるPrP<sup>Sc</sup>の脳内分布を、これまでに報告されたC-BSEの野外例と同様に示した。この結果から、脳内のPrP<sup>Sc</sup>の蓄積と分布は潜伏期間と相関していると示唆される。

本試験において、C-BSEの臨床症状が出現する10カ月前であった接種後10カ月の脳内接種牛において、脳幹

表2 ウエスタンブロット法による脳の各部位からのPrP<sup>Sc</sup>の検出

脳/脊髄の各部位	経過	未発症							発症後								
	牛No 接種後月数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 嗅脚	- <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	-	+
2 前頭部 大脳皮質	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+
3 前頭部 大脳髄質	-	-	-	++	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
4 線条体	-	-	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	
5 頭頂部 大脳皮質	-	-	-	-	-	-	++	+	+	++	++	++	++	++	-	++	
6 視床	-	-	-	++	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	
7 側頭部 大脳皮質	-	-	-	-	-	-	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++	
8 大脳髄質	-	-	-	-	-	-	++	+	-	+	++	+	+	-	-	-	
9 視床	-	-	++	-	ND	++	++	ND	ND	++	++	++	ND	++	-	ND	
10 海馬	-	-	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
11 後頭部 大脳皮質	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	++	++	++	+	++	+	
12 後頭部 大脳皮髄質	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+	-	-	++	-	
13 小脳皮質	-	-	-	-	-	++	-	+	++	++	++	++	++	++	+	++	
14 小脳髄質	-	+	+	++	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	
15 小脳脚	-	+	-	ND	-	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	
16 中脳	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
17 橋	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
18 延髄	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
19 脊髄 胸膨大部	ND	ND	ND	ND	++	++	++	+	ND	++	++	++	++	++	++	++	
20 脊髄 腰膨大部	ND	ND	ND	ND	++	++	++	++	ND	++	++	++	++	++	++	++	

※++：強陽性 (マウススクレイパー感染脳1.6 μg 組織等量より強いシグナル)、+：陽性、-：陰性、ND：データ無し

部と視床に PrP<sup>Sc</sup> の最も早い蓄積が起こることを明らかにした。PrP<sup>Sc</sup> は発症前に中枢神経組織に広く分布するとともに、脳幹部および視床に多く蓄積した。本試験により、脳の変性が現れた後、臨床症状が出現することも明らかとなった。

### 3. ま と め

牛を用いた BSE の感染実験により、C-BSE の病理発生機序の一端を明らかにしてきた。この成績は、BSE のリスク評価およびリスク管理措置の策定のための重要な科学的知見として活用されている。

牛の BSE 病原因子は英国に端を発する単一の株と考えられてきた。しかし、2003年からこれまでに90例以上の非定型 BSE と呼ばれる神経病理学および分子表現型の異なる非定型 BSE (L 型および H 型) が近年欧州諸国、北アメリカおよび日本で報告されている。非定型 BSE は、ほとんどが8歳以上の高齢牛で確認され、C-BSE の発生状況との関連性が低いことから、孤発性(自然発生的)である可能性が示唆される。畜産試験場では、脳内接種による非定型 L 型 BSE の牛への感染試験を実施し、臨床症状の出現時期が C-BSE よりも早く、牛に対して病原性が強いことを明らかにした。しかし、非定型 BSE の病理発生は不明な点が多く、BSE 対策の残された問題となっていることから、現在も非定型 BSE 感染牛を用いた試験研究による知見の集積を継続して非定型 BSE に関する研究成果は、次の機会に改めて紹介する。

最後に、長年数々の御指導、御助言によりこの研究を支えて頂いた動物衛生研究所、国立感染症研究所、北海道大学、アジア太平洋プリオン研究会の諸先生、北海道立総合研究機構および行政機関の方々、牛を提供して頂いた生産者の皆様、関係各位にこの場を借りて感謝いたします。

### 4. 参 考 文 献

Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121 : 419-420 (1987).

Kimura, K.M., Haritani, M., Kubo, M., Hayasaka, S., and Ikeda, A. Histopathological and immunohistochemical evaluation of the first case of BSE in Japan. *Vet Rec* 151 : 328-330 (2002).

Wells, G.A., Wilesmith JW, and McGill IS Bovine

spongiform encephalopathy : a neuropathological perspective. *Brain Pathol* 1 : 69-78 (1991).

Prusiner, S.B. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252 : 1515-1522 (1991a).

Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218 : 1309-1311 (1982).

Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., and Caramelli, M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy : molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci* 101 : 3065-3070 (2004).

Biacabe, A.G., Laplanche, J.L., Ryder, S., and Baron, T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5 : 110-115 (2004).

Buschmann, A., and Groschup, M.H. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* 192 : 934-942 (2005).

Masujin, K., Matthews, D., Wells, G.A., Mohri, S., and Yokoyama, T. Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. *J Gen Virol* 88 : 1850-1858 (2007).

Vidal, E., Marquez, M., Tortosa, R., Costa, C., Serafin, A., and Pumarola, M. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages. *J Virol Methods* 134 : 15-29 (2006).

Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Takata, M., Fukuda, S., Nikaido, S., Fujii, K., Onoe, S., Mohri, S., and Yokoyama, T. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in cases of bovine spongiform encephalopathy detected by fallen stock surveillance in Japan. *J Vet Med Sci* 73 : 1465-1471 (2011).

Iwata, N., Sato, Y., Higuchi, Y., Nohtomi, K., Nagata, N., Hasegawa, H., Tobiume, M., Nakamura, Y., Hagiwara, K., Furuoka, H., Horiuchi, M., Yamakawa, Y., and Sata, T. Distribution of PrP (Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 59 : 100-107

- (2006).
- Taylor, D.M., Brown, J.M., Fernie, K., and McConnell, I. The effect of formic acid on BSE and scrapie infectivity in fixed and unfixed brain-tissue. *Vet Microbiol* 58 : 167-174 (1997).
- Simmons, M.M., Harris, P., Jeffrey, M., Meek, S.C., Blamire, I.W., and Wells, G.A. BSE in Great Britain : consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec* 138 : 175-177 (1996).
- Debeer, S., Baron, T., and Bencsik, A. Neuropathological characterisation of French bovine spongiform encephalopathy cases. *Histochem Cell Biol* 120 : 513-521 (2003).
- González, L., Martin, S., Houston, F.E., Hunter, N., Reid, H.W., Bellworthy, S.J., and Jeffrey, M. Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol* 86 : 827-838 (2005).
- Hamir, A.N., Miller, J.M., Stack, M.J., and Chaplin, M. J. Failure to detect abnormal prion protein and scrapie-associated fibrils 6 wk after intracerebral inoculation of genetically susceptible sheep with scrapie agent. *Can J Vet Res* 66 : 289-294 (2002).
- Vidal, E., Marquez, M., Ordonez, M., Raeber, A.J., Struckmeyer, T., Oesch, B., Siso, S., and Pumarola, M. Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests. *J Virol Methods* 127 : 24-32 (2005).
- Orge, L., Simas, J.P., Fernandes, A.C., Ramos, M., and Galo, A. Similarity of the lesion profile of BSE in Portuguese cattle to that described in British cattle. *Vet Rec* 147 : 486-488 (2000).
- Siso, S., Ordonez, M., Cordon, I., Vidal, E., and Pumarola, M. Distribution of PrP(res) in the brains of BSE-affected cows detected by active surveillance in Catalonia, Spain. *Vet Rec* 155 : 524-525 (2004).
- Wells, G.A., and Wilesmith, J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol* 5 : 91-103 (1995).
- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H.A., and Beekes, M. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75 : 9320-9327 (2001).