

厚生労働省食品安全確保研究事業（牛海綿状脳症対策研究分野）  
「血液中でのプリオンタンパクの存在様式の解析と血液製剤からのプリオン除去の研究」  
分担研究報告書

実験動物を用いたプリオンタンパクの存在様式および動態についての病理学的解析

分担研究者名 永田典代 国立感染症研究所・感染病理部  
協力研究者名 長谷川秀樹、佐藤由子、樋口好美、  
佐多徹太郎 同・感染病理部

### 研究要旨

昨年度に引き続き、血液関連の細胞におけるプリオンの伝播を病理学的に解析することを目的とする。特に、濾胞樹状細胞（FDC）、血液細胞と正常プリオン(PrP<sup>C</sup>)および異常プリオン(PrP<sup>SC</sup>)の相互関係について着目していく。今年度はマウスを用いたプリオン病発症実験を行い、脳と脾の PrP<sup>SC</sup> の局在を観察した。その結果、マウスプリオン乳剤を脳内接種後、プリオン病を発症した B6 マウスの脳幹白質の神経線維と大脳皮質および B 細胞領域の濾胞中心に PrP<sup>SC</sup> の存在を認めた。T 細胞領域あるいは赤脾髄では陰性であった。これらの結果は前年度に検索した PrP<sup>C</sup> の局在と相関した。また、脾における PrP<sup>SC</sup> 陽性細胞の CD 分類を試みたが、蟻酸処理済みパラフィン切片では抗体の使用が不可能であった。

#### A. 研究目的

本研究班では特に血液へのプリオンの移行を調べることを目的としており、FDC、血液細胞と PrP<sup>C</sup> および PrP<sup>SC</sup> の相互関係について着目している。本年度はマウスを用いたプリオン病発症実験を行い、脳と脾における PrP<sup>SC</sup> の局在を病理学的に解析した。

#### B. 研究方法

##### 1) 感染実験

6 週齢の B6 マウス 10 匹に対し 1% マウスプリオン脳乳剤を 25μl 用いて脳内接種した。このうち 5 匹を病理組織学的解析に用い、残りは生存日数と生存率を調べた。動物実験は国立感染症研究所動物

実験委員会規定に従い実施した。

##### 2) 組織切片作成方法

マウスプリオン脳乳剤を接種した B6 マウスを接種後 148 日目に解剖し、脳と脾を採取した。10%ホルマリン緩衝液による浸漬固定後、切り出し、98%蟻酸処理を室温 1 時間行った。その後、50% - 100%エタノール系列による脱水とキシレン処理後、パラフィン包埋を行い、組織切片を作製した。

##### 3) PrP<sup>SC</sup> 抗原の検出

脱パラフィン後に 1mM 塩酸水中で 121°C 20 分オートクレーブ処理による PrP<sup>C</sup> の破壊と PrP<sup>SC</sup> タンパク抗原の賦活

化を行った。室温に戻して洗浄後、0.3% 過酸化水素水加メタノールによって内因性ペルオキシダーゼを失活させ、10%正常ヤギ血清と室温で5分間反応させて非特異反応を阻止した。一次抗体として抗プリオンタンパクウサギ抗体 (T4 mono-specific rabbit antibody, polyclonal、感染病理部高橋秀宗博士作製、1000倍希釈)を用い、これと4°C一晩反応させた。洗浄後抗ウサギ Envision+ (Dako) を室温30分反応させ、その後DABで基質の発色反応を行い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

#### 4) CD分類

抗マウス CD21、CD45R、CD5 抗体をそれぞれ使用して蟻酸処理後の脾パラフィン組織切片上でこれらの抗原の検出を試みた。

### C. 研究結果

#### 1) 感染実験

プリオン脳乳剤脳内接種後のマウスは接種20週目頃から消瘦がみられ、接種後155、163、168日目に各1匹ずつ、172日目に2匹が死亡した。発症率と死亡率はいずれも100%であった。

#### 2) 病理学的解析

接種後148日目に解剖したマウスの脳と脾において免疫組織学的に PrP<sup>Sc</sup> 抗原を検出した (図)。脳においては脳幹部の神経網が特に陽性所見が強く、脾ではB細胞領域の濾胞中心にのみ陽性細胞を検出した。脾においてCD分類を試みたが、蟻酸処理を行った組織切片では抗

体の使用が不可能であった。

### D. 考察

昨年度は実験動物における PrP<sup>C</sup> の局在が脾 FDC と神経線維であることを示した。今回のマウスプリオン脳内接種マウスにおける PrP<sup>Sc</sup> 抗原の局在はそれと一致した。また、脳内接種後でも PrP<sup>Sc</sup> は脾 FDC に移行した。異常プリオン蛋白摂食後に扁桃等のリンパ組織の FDC 細胞に異常プリオンが脳への蓄積に先行することはスクレイピー研究及び BSE 研究の過程ですでに明らかにされている。

2004年2月に医学雑誌 LANCET に掲載された2つの論文は汚染血液による異常プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)の伝播の可能性を示唆した。このうちの一つの Herzog らによる論文は、BSE 陽性脳乳剤をカニクイザルに静脈内接種すると、サルはプリオン病を発症することを明らかにしたものであった(Herzog et al., Lancet 2004; 363: 422-28)。彼らはカルノア固定による組織学的解析を試み、腸管の神経叢のみならず腸管平滑筋にも異常プリオンが蓄積していることを初めて示した。カルノア固定液は水を含まない迅速固定液なので、比較的生組織に近い状態で解析を実施することができる。今回我々が実施した従来から用いられているホルマリン固定、蟻酸処理組織は取り扱いが安全であるが、微量な異常プリオンの検出と CD 分類は不可能であり、解析は制限された。そのため、血液関連細胞と PrP<sup>Sc</sup> との関連性を明らかにすることはできなかった。今後、我々もマウスにおいて静脈内接種の試みとカルノア固定による同様の解析を行い、

蟻酸処理のそれと比較することが必要である。

#### E. 結論

BSE 脳内接種後のプリオン病発症マウスにおける PrP<sup>Sc</sup> の局在を観察した結果、正常動物の脳および脾組織における PrP<sup>C</sup> 抗原の局在と関連した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Sato Y, Hatano I, Harashima A, Suzaki Y, Yoshii T, Hashikawa T, Sata T, Horiuchi Y, Koike S, Kurata T, Nomoto A. A poliomyelitis model through mucosal infection in transgenic mice bearing human poliovirus receptor, TgPVR21. *Virology* 2004, 321: 87-100

Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Sato Y, Dizon F, Paladin FJ, Olveda RM, Odagiri T, Tashiro M, Sata T. SARS Coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2003, 56: 139-141

Takeuchi K, Miyajima N, Nagata N, Takeda M and Tashiro M. 2003. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Research* 2003, 94: 11-16

Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, Iinuma Y, Arakawa Y. A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* 2003, 47: 443-451.

##### 2. 学会発表

永田典代、清水博之、吉河智城、波多野いく持、原嶋綾子、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田毅、野本明男、岩崎琢也：ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス(TgPVR21)の粘膜免疫モデル。第51回日本ウイルス学会、2003年10月京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

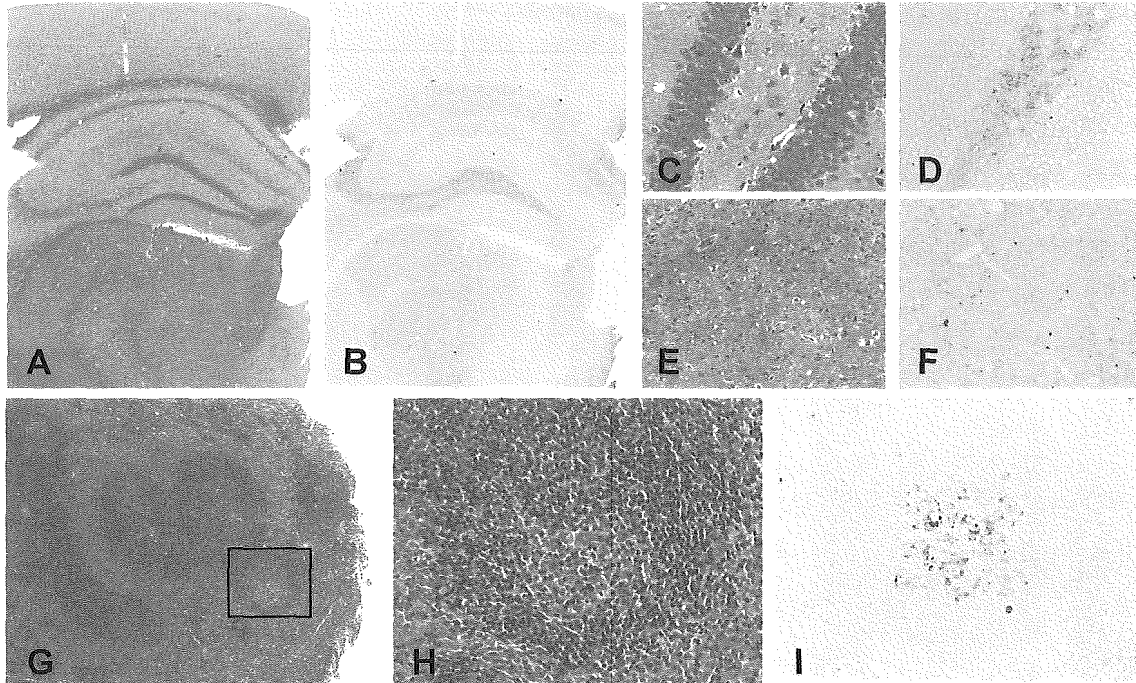


図 マウスPrP<sup>Sc</sup> 脳内接種後の脳と脾組織。

A~F. 大脳皮質、海馬、視床の神経網にPrP<sup>Sc</sup>抗原が陽性であった (A, B)。海馬の一部の錐体細胞の萎縮が見られたが、神経網に抗原の沈着が見られた(C, D)。視床において軽度な空胞の形成とグリア細胞の増加がみられ、神経網に抗原の沈着が見られた (E, F)。G~I. 脾 B 細胞領域の濾胞中心に PrP<sup>Sc</sup> 抗原陽性細胞が認められた (I)。A, C, E, G, H. ヘマトキシリン・エオジン染色。B, D, F, I. 免疫組織化学による PrP<sup>Sc</sup> 抗原の検出。

## 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
岡田義昭、 奥山堅司、 水沢左衛 子、他。	血漿分画製剤の安 全性	山本保博 監修	血漿分画製剤 の安全性；臨 床マニュアル アルブミン	メディカ ルレビュー ー社	東京	2003	191

## 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
Nagata N, Iwasaki T, Ami Y 他	A poliomyelitis model through mucosal infection in transgenic mice bearing human poliovirus receptor, TgPVR21	Virology	321	87-100	2004

20031212

以降 P24～P43までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P23「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください