

10. 高感度バイオアッセイ系の開発

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長
研究協力者 山河 芳夫 (国立感染症研究所細胞化学部)
佐多徹太郎、高橋 秀宗 (国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨 (1) ウシプリオン発現 Tg マウスを4系統作出し、ゲノムウォーキングにより染色体上の遺伝子挿入部位をすべての系統について決定した。Tg 4系統のうち3系統についてプリオン KO マウスとの交配により、Tg ホモ、ヘミを含む3系統5種類のウシプリオン単独発現マウスを作成した。(2) BSE 病原体が接種された Tg#39 マウスでは、接種後約 100 日で脾臓に、200-300 日で脳に BSE プリオンと同じ特徴的な糖鎖型を持つ PrP^{SC} の蓄積がウエスタンブロット法で検出され、感染が成立した事が判った。しかし、接種後 500 日を経過してもプリオン病を発症したマウスは認められなかった。(3) Tg#39 マウスに病原体を接種後、240 日で脾臓の PrP^{SC} を検出することにより、現行のウエスタンブロット法と同等の感度で PrP^{SC} をバイオアッセイで検出する事が出来た。これは、現行のエライザ法の 80 倍の感度に相当した。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症 (BSE) の国内 15 頭目が本年 2 月に確認されるなど、BSE は引き続き食の安全性に対する大きな社会的問題である。一方、BSE 病原体である異常型プリオンタンパク質が正常型からどのようにして形成されるのか、またウシ海綿状脳症の感染・発症機構については不明の点が多く、科学的な解明が必要であり、これらの研究のためには、とくに実験動物を用いた感染実験系およびバイオアッセイ系が必須である。本研究では、プリオンノックアウトマウスを使用してトランスジェニック (Tg) によりウシプリオン単独発現マウスを作成し、BSE 乳剤を接種し、安定した (株化) ウシ異常型プリオン蛋白の作製と供給、BSE の発症機構、病理解析、薬剤スクリーニング、さらに感染価測定、診断系のためのバイオアッセイ系確立を目的とする。今年度は、引き続き各ラインの Tg マウスをプリオンノックアウトへ導入し、系統化するとともに、ウシプリオンタンパク質を単独発現する Tg マウスに BSE 脳乳剤を接種し、バイオアッセイに適した系統を選び出すことを目指した。

B. 研究方法

1) ウシプリオン単独発現トランスジェニックマウス作成と解析:

強発現用 CAG プロモーターとホルスタイン種

ウシプリオン遺伝子 DNA との融合遺伝子を導入した Tg マウス 4 系統 (#39, #91, #94, #96) のうち、導入部位の不明であった #96 について、2 段階ゲノムウォーキングにより導入遺伝子部位の近傍遺伝子配列を決定した。各 Tg マウスは、プリオンノックアウトマウス Prnp^{-/-} (C57BL/6 congenic 系、理研糸原博士より供与された) と交配することにより、ウシプリオン単独発現 Tg マウスを作成・系統化し、BSE ウシ脳乳剤の接種試験に用いた。

2) 接種材料と接種:

和歌山陽性ウシの視床から作成した標準 10% 脳乳剤を PBS で希釈して 5% 乳剤及び、その段階希釈液を作成して、その 25 μ l をマウスの脳内に接種した。腹腔内への接種では 100 μ l の 1.25% 乳剤をマウスに接種した。(脳乳剤の作成及び性状については本年度の山河の報告書を参照されたい)

3) 感染の確認:

1 群 5-7 匹とし、病原体を接種後 100 日程度の間隔で 1 匹を殺処分して、ウエスタンブロット法 (WB 法) で脳及び脾臓における PrP^{SC} の蓄積を検出することにより BSE のマウスへの感染を確認した。なお、乳剤は摘出臓器の半量を用いて作製した。残りは 10%ホルマリン-PBS) 中に保存して免疫組織化学 (IHC) の試料とした。WB 法は確認検査要項の記載に従って行ない、PrP^{SC} の検出に 10mg 組織等量を要する場合を (+)、1mg 程度

を必要とする場合を(++)、100 μ g 組織量以下でも検出出来る場合を(+++)で表した。なお、1次抗体(抗プリオン抗体)は帯広畜産大学で作成したモノクローン抗体44B1を0.2-0.4 μ g/ml濃度で使用した。

4)免疫組織化学(IHC)によるPrP^{SC}の検出:

WB法でPrP^{SC}が検出された場合には、確認検査要項に準じてIHCを行なった。抗体はウサギポリクローナル抗体T4を用いた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いる実験については、実験動物委員会の承認を得て適切に取り扱った。異常型プリオンの取り扱い及びマウスへの感染実験は国立感染症研究所におけるバイオセフティー安全規定を遵守して行った。

C. 結果

1)ウシプリオン単独発現トランスジェニックマウス作成と解析:

ウシプリオン Tg マウス#96 は多数コピーが導入されていると考えられるが、ゲノムウォーキングにより、transgene が少なくとも第 10 染色体 A2 領域に挿入されていることが判明した。この領域にはとくに機能的な遺伝子の存在は予想されていない。しかし#96 では transgene をもつ雌は正常に発育するが、雄は約 2 週齢という早期に死亡することが判った。従って、#96 のプリオンノックアウトへの導入は行わなかった。一方、#39 は transgene が第 10 染色体 A3.3 領域の Prolactin-like protein A (PrIpa) 遺伝子座に挿入されており、Tg ホモマウスは本遺伝子のノックアウトとなっている可能性が想定された。そのことが原因かどうかは不明であるが、#39Tg ホモマウスは出生時から既に低体重を示し、8 週齢頃より背部彎曲と発育不良を示し、200 日齢から 300 日齢で極度の削瘦により死亡した。また、#91 は transgene が第 2 染色体 A3 領域の C3G (Grf2) 遺伝子座に挿入されていた。C3G は Ras ファミリーに属する Rap1 の活性化因子であり、細胞接着や胚発生に重要な役割を果たしていることが知られている。Tg ホモマウスは本遺伝子のノックアウトとなるため胎性致死と考えられ、実際に Tg ホモマウスは得られなかった。#94 は transgene が第 3 染色体 A2 領域に挿入されており、この領域にはとくに機能的な遺伝子の存在は予想されておらず、Tg ホモマウスも得られたが、脳および脾臓でのウシプリオンタンパク質の発現が比較的低い系統であった。

2)異常型プリオンの伝達

各系統のウシプリオン単独発現 Tg マウスに BSE 脳乳剤を接種して、PrP^{SC} の蓄積を WB 法で確認した結果を表-1 に示した。BSE 脳乳剤の脳内接種によって、いずれの系統のマウスでも 100-200 日の間に脾臓で PrP^{SC} の蓄積が WB 法で認められるが、脳での蓄積が認められるようになるには 200-300 日を要した。現在、400 日以上観察しているが、未だ神経症状を呈した個体は観察されていない。作成したマウスの内で Tg ホモである Tg#39(BoPrP^{+/+})が BSE プリオンに対して最も感受性が高いが、PrP^{SC} が脳で認められる 200 日前後で高率に死亡してしまう。なお、この時期に蓄積している PrP^{SC} の量は極めて僅かであり、何らの神経症状も認められないので、死亡原因はプリオン病の発症によるものとは考えられず、Tg#39(BoPrP^{+/+})がもともと低体重で、発育不良であることが早死の原因と考えられる。

系統	boPrP zygosity	脳内接種 (5%和歌山脳乳剤, 25 μ l)			その他
		脾臓	脳	神経症状	
		日数 (PrPsc)	日数 (症状)		
#39	++	121(++)	195(++)	198* (-)	寿命-220日
#39	+/-	106(++)	312(+)	532 (-)	観察中
#91	+/-	152(++)	218(-)	352 (-)	観察中
#94	++	103(+)	169(-)	303 (-)	観察中
#94	+/-	169(+/-)	169(-)	190** (-)	打ち切り
脳内接種 (1.25%和歌山脳乳剤, 100 μ l)					
#39	++	138(++)	210(-)	218* (-)	寿命-220日
#39	+/-	192(++)	3** (-)	496 (-)	観察中
#91	+/-	103(++)	169(-)	303 (-)	観察中

表-1 Tg マウスの脾臓、脳での PrP^{SC} の検出に要する BSE 脳乳剤接種後の日数

3)Tg#39(BoPrP^{+/+})を用いた PrP^{SC} の検出感度

上記の様にバイオアッセイに最も適していると思われた Tg#39(BoPrP^{+/+})は発育不良と早期死亡を呈するので、アッセイには使う事が出来なかった。そこで Tg ヘテロ系統の Tg#39(BoPrP^{+/+})を用いてバイオアッセイの感度について検討した。即ち、和歌山例の 5%脳乳剤を段階的に希釈し、その 25 μ l を Tg#39(BoPrP^{+/+})に脳内に接種し、脳、脾臓における PrP^{SC} を WB 法で検出した。実験は未だ継続中であるが、図-1 に接種後 244 日に安楽殺したマウスの脾臓に蓄積した PrP^{SC} を検出した結果を示した。5%脳乳剤を 1,000 倍希釈して接種したマウスの脾臓には PrP^{SC} の蓄積が認められたが、10,000 倍希釈では蓄積を認める事は出来なかった。この結果から、Tg#39(BoPrP^{+/+})マウスに BSE プリオンを感染させるのに必要な最低の組織量(最低感染重量)は 1.25 μ g であり、概ね WB 法の検出感度に匹敵し、現行のエライザ法と

の比較では約 80 倍高感度に PrP^{SC} を検出することが可能である。

(表-2 参照) 本年度の山河の報告参照)

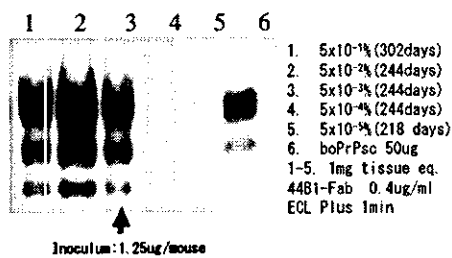


図-1 Tg#39 (+/-)の脾臓を用いたBSE乳剤(和歌山)の最小感染価の測定(和歌山BSE, 0.5%~5x10^{-5%}, IC, 25u)

飼乳期	ELISA	W.B.	Bio Assay
	BioRad, レビオ, ニッピ	mAb44B1を用いて確認検査に準拠	#39 Tg(hemi)を用いて脾臓で判定
和歌山		1-2ug/lane	1.25ug/mouse
神奈川-2	100ug/well	4-8ug/lane	N.D.
神奈川-1		2-4ug/lane	N.D.

表-2 BSE プリオンの検出に要する最小の組織量

4) Tg#39 (BoPrP^{+/+}) マウスに蓄積した PrP^{SC} の解析:

図-2にTgマウス#39(BoPrP^{+/+})の脳、及び脾臓に蓄積したPrP^{SC}のWB像及び免疫組織染色の結果を示した。WB像からも判るようにTgマウスの脳及び脾臓に蓄積したPrP^{SC}の糖鎖型は陽性コントロールとして同時に泳動・染色したBSEプリオンと同じであり、BSEプリオンが確かにTgマウスに伝播し、増幅したことは明らかである。また、IHCの結果から、BSEプリオンは脾臓では濾胞樹状突起細胞(Follicular dendritic cell:FDC)に、脳では神経細胞の膜に沈着している事が判った。脳におけるBSEプリオンの蓄積は極めて弱く(陽性コントロールに比べて1/100)であり、蓄積の極初期状態と考えられる。

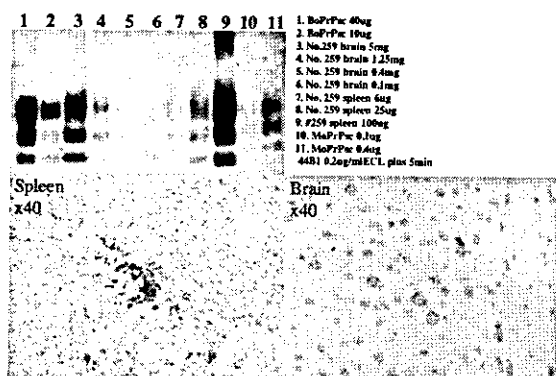


図-2 #39boTg (+/+)マウスにおけるBSEプリオンの蓄積 (No. 259, 198dpi)

D/E. 考察及び結論

ウシプリオン発現 Tg マウスを4系統作出し、ゲノムウォーキングにより染色体上の遺伝子挿入部位をすべての系統について決定した。Tg4系統のうち3系統についてプリオン KO マウスとの交配により、Tg ホモ、ヘミを含む3系統5種類のウシプリオン単独発現マウスを作成した。今回これら3系統5種の boTg マウスに BSE プリオンの接種を試みたが、接種後 500 日以上が経過したマウスにおいても神経症状を呈したマウスは認められていない。しかし、何れもマウスでも脾臓への蓄積は接種後 100 日程度で認められているので、これを用いたバイオアッセイは可能である。Tg#39 マウスでは、BSE 病原体の接種後約 100 日で脾臓に、200-300 日で脳に BSE プリオンと同じ特徴的な糖鎖型を持つ PrP^{SC} の蓄積がウエスタンブロット法で検出され、感染が成立した事が判った。Tg#39 マウスに病原体を接種後、240 日で脾臓の PrP^{SC} を検出することにより、現行のウエスタンブロット法と同等の感度で PrP^{SC} をバイオアッセイで検出する事が出来た。これは、現行のエライザ法の 80 倍の感度に相当した。

F. 研究発表 該当無し。

1 1. 動物プリオンタンパクの遺伝子解析

分担研究者 石黒 直隆 岐阜大学食品環境衛生学教室 教授

研究要旨 ウシの PrP 遺伝子多型を解析する目的で、ウシ PrP 遺伝子の発現調節域である Exon 1 の近傍領域と Exon 3 の ORF 領域について検討した。解析したウシの試料はホルスタイン 863 頭と黒毛和牛 186 頭の合計 1049 頭である。Exon 1 近傍の多型解析は Exon 1 上流の 23bp の挿入/欠失変異と Exon 1 下流の 12bp の挿入/欠失変異であり、ホルスタインでは 23bp 挿入/欠失変異はホモで欠失しているのが 70%であるのに比べ、和牛ではホモの欠失は少なく、ヘテロの挿入/欠失変異 (61%) を多く保有していた。12bp 挿入/欠失変異に関してもホルスタインではホモの欠失が多いのに比べ、和牛ではヘテロの変異が多かった。ORF 内のオクターリピートはホルスタインおよび和牛とも 6 回のリピートが 90%を占め、5 回のリピートのホモはホルスタインではわずかに 4 頭であった。和牛においても ORF 内の変異部位はホルスタインと同様に 234 番と 576 番の DNA 部位のみであり、新たな DNA 変異は検出されなかった。DNA の塩基置換をホルスタインと和牛のアリルで比較すると、両種には大きな違いが検出された。PrP 遺伝子の発現に影響を与える Intron 1 内の 12bp 挿入/欠失変異について CAT アッセイで PrP 遺伝子発現を解析した。その結果、12bp の挿入/欠失変異は PrP 遺伝子の発現に大きく影響しないことが明らかとなった。

A. 研究目的

動物プリオン病は感染性の異常プリオン蛋白質を経口的に摂取することにより起こり、長い潜伏期の後発症する。なかでもヒツジやヤギのスクレイピーは宿主の PrP 遺伝子のアミノ酸多型により、病気の発症時期や潜伏期間が大きく影響される。一方、ウシに関しては PrP 遺伝子の蛋白コード領域内に塩基置換が少なく、アミノ酸置換と牛海綿状脳症 (BSE) の発症との間には特異的な関係はないとされてきた。これまでにウシ PrP 遺伝子のアミノ酸をコードする ORF 領域の多型として、オクターリピート回数と一部のアミノ酸置換が報告されている。また、PrP 遺伝子上流域の Exon 1 領域近傍の多型も報告されている。日本での BSE 感染牛が発見されるにつれ、日本での感染牛の PrP 遺伝子多型を解析する機会が得られつつある。本年度は昨年度に引き続きホルスタインの PrP 遺伝子多型解析を行うと共に、日本の在来種である和牛に関しても PrP 遺伝子の多型解析を行った。一方、ウシの PrP 遺伝子内の ORF 領域以外にも DNA 多型が存在することが知られている。特に Exon 1 上流 1,500bp には 23bp の挿入/欠失部位が存在する。ドイツにて発症した BSE 感染牛はこの挿入/欠失と関連するとの報告もあり、23bp 挿入/欠失と BSE 発症との関連を検討する必要が

生じた。また、Exon 1 の下流域である Intron 1 内にも 12bp の挿入/欠失部位が存在する。ウシをはじめ多くの動物で PrP 遺伝子の発現がこの Intron 1 内の多型により影響されるとの報告もあり、Intron 1 内の多型と PrP 遺伝子発現との関連に興味を持たれている。特に 12bp の挿入/欠失部位内には発現に関与する SP1 サイトが存在することから、PrP 遺伝子の発現に何らかの影響を与えているものと推察される。本年度はホルスタインと和牛に関して 12bp の挿入/欠失の有無と PrP 遺伝子の発現活性についても検討した。

B. 研究方法

研究対象検体：ウシの PrP 遺伝子の多型解析に用いたサンプルは、昨年度調査した帯広市内の「と畜場」にて採取したホルスタイン 358 頭と 8 牧場からのホルスタイン 303 頭の血液に加え、今年度は 202 頭のホルスタインより血液を採取して検査した。また、和牛に関しては岐阜県下 5 地区より採血して保存してあった DNA サンプル 186 頭を用いた。BSE 感染牛のサンプルは、天塩、神奈川、埼玉、和歌山、釧路、北見の BSE 感染牛由来のサンプルである。

検査方法：ウシ血液はヘパリンを凝固防止剤として用いて採血し、Qiagen のキットを用いて総

DNA を分離した。ウシ PrP 遺伝子コード領域 (ORF) は PCR にて増幅後、ダイレクトシーケンスにて DNA の塩基配列を決定して塩基配列とアミノ酸の多型解析を行なった。ORF 内のオクターリピートについては、リピート回数を電気泳動にて判断できるようにプライマーを設計し、500bp のバンドとして検出した。ウシ PrP 遺伝子の Exon 1 上流域の 23bp の挿入/欠失部位の解析は PCR 後、3%アガロースゲルにて PCR 産物を電気泳動にて判定した。Intron 1 内の 12bp 挿入/欠失変異は PCR にて挿入/欠失部位を増幅後、ダイレクトシーケンスと PCR 産物を制限酵素 *SacII* にて消化し電子泳動にて 12bp の挿入/欠失を判定した。

Intron 1 内の 12bp がもたらす PrP 遺伝子の発現量は、CAT 発現ベクター内に 12bp を保有するクローンと 12bp を欠失したクローンをそれぞれクローニングして CAT 活性を測定することにより判定した。

(倫理面への配慮)

本研究で解析したウシの血液の多くはと畜場にてと殺された動物に由来し、BSE 検査で陰性のものであり、実験動物にかかわる問題はない。また、一部のホルスタインの血液は畜主の同意を得て採血した血液である。和牛の検体も畜主の同意を得て採血した検体である。

C. 研究結果

本年度解析した研究内容を図 1 に示した。上流域の多型解析は Exon 1 の上流域の 23bp の挿入/欠失変異と Intron 1 内の 12bp の挿入/欠失部位である。PrP 遺伝子の ORF 内の多型解析は、オクターリピート回数、ORF 内の塩基置換とアミノ酸置換、それに以前ホルスタインで検出した 288 塩基対 (96 アミノ酸) の欠失変異である。

ウシの PrP 遺伝子の多型解析: ウシ PrP 遺伝子 Exon 1 の上流域の 23bp の挿入/欠失変異と下流域の 12bp の挿入/欠失変異の結果を図 2A と図 2B にそれぞれ示した。23bp の挿入/欠失変異は PCR 産物を 3%のアガロースゲルで電気泳動することにより判別が容易であった。ホルスタインでは検査した 202 頭の内約 70%が 23bp をホモで欠失しており、ホモで保有しているのもわずかに 4 頭であった。一方、和牛は 61%がヘテロで 23bp を保有しており、ホルスタインに比べて多かった。23bp の挿入/欠失のアリルの比率などを表 1 に示した。Intron 1 内の 12bp の挿入/欠失変異は PCR にて挿入/欠失領域を増幅後、制限酵素 *SacII* にて

消化し電気泳動にて判定した (図 2B)。検査したホルスタインの約半数は 12bp をホモに欠失しており、ホモに有しているウシは 7%と少なかった。一方、和牛では約 60%のウシがヘテロの保有を示し、12bp の保有率はホルスタインより高かった。23bp と 12bp の挿入/欠失変異率はホルスタインと和牛間で有意に異なっていた (表 1)。

ウシの PrP 遺伝子 ORF 内の多型解析: ORF 内のオクターリピート数、288bp の欠失変異および DNA 置換に関して解析した。以前の解析でホルスタインから検出された 288bp (96 アミノ酸) の欠失変異は、今回検査した 863 頭のホルスタインと 186 頭の和牛からは検出さえなかった。オクターリピート数もホルスタインでは 89%が 6 回づつのホモであり、6 回と 5 回のヘテロは 11%で、5 回のホモはわずか 4 頭であった。和牛にても 93% (検査頭数 186 頭) が 6 回のホモであり、6 回と 5 回のヘテロが 7%で、5 回のホモは検出されなかった。ORF 内の DNA 置換は、234 番 (g/a) と 576 番 (c/t) のみであり、新しい DNA 塩基置換やアミノ酸置換は検出されなかった (図 2)。ホルスタインと和牛とのアリルの頻度に関して表 1 にまとめた。オクターリピートに関してホルスタインと和牛では有意差は検出されなかったが、Exon 1 近傍の 12bp と 23bp の挿入/欠失変異では有意差が検出された。また、234 番と 576 番の DNA 塩基置換においても両系統のウシでアリルの保有に有意差が観察された。

BSE 感染牛での多型解析: BSE 感染牛に関して PrP 遺伝子の多型について解析した。解析頭数が 6 頭と少なく、統計的に十分な解析を行なうことができなかったが、ORF 内に特異的な変異部位もなく、Exon 1 近傍の変異箇所に関して大きな特徴は検出されなかった (表 1)。

12bp の挿入/欠失変異による PrP 遺伝子の発現活性: ウシ PrP 遺伝子の Intron 1 内には PrP 遺伝子の活性に影響を与える配列が存在することは、これまでの研究で示唆されていた。本研究では、SP1 サイトを含む 12bp の挿入/欠失変異と PrP 遺伝子の発現活性に関して検討した。CAT アッセイの結果を図 3 に示した。図 3 に示す通り、12bp の挿入を有することは SP1 サイトを有することであり、12bp を欠失ことは SP1 サイトを失うことになる。12bp を有する配列の CAT 活性を 100%とした時、12bp を欠失した場合の CAT 活性は、60%と低下した。しかし、本 CAT 活性は実験ごとによる変動が大きいことから、12bp の挿入/欠失 (SP1

の保有)により PrP 遺伝子の発現が大きく影響するとは結論づけられなかった。図 3 に示すごとく、+114~+892 までの欠失クローンは CAT 活性が 5%と減少することから Intron 1 内に転写活性に影響する配列が存在することは確かである。6 頭の BSE 感染牛の内、4 頭はホモの欠失であり、2 頭は挿入/欠失のヘテロであることから、12bp の挿入/欠失は BSE 発症とはあまり関係がないかもしれない。

D. 考察

本年度は昨年度に引き続きホルスタインでの PrP 遺伝子の DNA 多型について解析を行なった。ホルスタインの DNA 多型と比較する目的で黒毛和牛の DNA 多型についても検討した。PrP 遺伝子の ORF 内の多型解析では、ホルスタインおよび和牛とも約 90%のウシが 6 回のオクターリピートをホモに有しており、6 回と 5 回のリピートを有しているウシは 10%前後であった。5 回のリピートをホモで有しているウシはホルスタインでわずかに 4 頭であり、海外で報告されている 7 回のリピート数は検出されなかった。BSE 感染牛 6 頭とも全て 6 回のリピートをホモで有しており、BSE 発症とオクターリピートの回数との間には有意な関係は存在しない。

以前の研究で検出した 288bp の欠失変異は、ホルスタインと和牛を合わせた 1,049 頭中には残念ながら検出されなかった。この変異が検出個体特有の体細胞変異であるかどうかは不明であるが、検出されてから 12 年以上も経過しており、その子孫や家系のウシを検出することはかなり難しいものと思われる。本研究ではホルスタインに加えて和牛に関して ORF 内の DNA 多型解析を行なったが、ホルスタインで検出されている 234 番と 576 番の塩基置換を除いて新しい塩基置換は検出されなかった。ただ、変異を有するアリの頻度はホルスタインと和牛では異なっており、育種や繁殖手法の違いを反映しているのではないかと思われる。また、検査した和牛がかなり限られた地域に由来することから、調査した和牛の由来に依存する可能性が高い。

以前から議論されてきた PrP 遺伝子の発現における Intron 1 の役割について 12bp の挿入/欠失多型から解析した。今回の結果を見る限り、PrP 遺伝子の発現は 12bp の挿入/欠失変異により影響されることは少ないものといえる。PrP 遺伝子の発現に影響を与える領域を、250bp 程度まで縮めるこ

とができているが、どの塩基配列が重要でどのようなメカニズムで PrP 遺伝子の発現が制御されているのか未だ不明である。今後の解析が待たれる。

E. 結論

日本で飼育されているホルスタイン 863 頭と和牛 186 頭の PrP 遺伝子の多型解析を行なった結果、Exon 1 近傍の領域に 23bp と 12bp の挿入/欠失変異を検出し、その変異についてのアリル頻度はホルスタインと和牛では異なっていた。また、PrP 遺伝子の ORF 内でのオクターリピート数の変異、234 番目と 576 番目の DNA 塩基置換を検出した。DNA 塩基置換はホルスタインと和牛ではアリル頻度が異なっていた。今回解析したウシの中には 288bp の欠失変異は検出されなかった。検索した変異部位に関する限り、健康牛と BSE 感染牛では大きな差は検出されなかった。また、Exon 1 下流域の 12bp の挿入/欠失変異は PrP 遺伝子の発現には大きな影響を与えないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M: Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J Vet Med Sci* 66:1293-1295, 2004.
- 2) K C-L, Umetani A, Matusi T, Ishiguro N, Shinagawa M, Horiuchi M: Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320:41-51, 2004.
- 3) K C-L, Karino A, Ishiguro N, Shinagawa M, Sato M, Horiuchi M: Cell-surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol* 85:3473-3482, 2004.
- 4) Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M: Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. *J Vet Med Sci* 67:321-323, 2005.
- 5) Kataoka N, Nishimura M, Horiuchi M, Ishiguro N: Surveillance of chronic wasting disease in Sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Japan. *J Vet Med Sci* 67:349-351, 2005.

2. 学会発表

- 1) 中満智史、石黒直隆、前田秋彦、堀内基広、宮沢孝幸：ウシプリオン遺伝子の多型解析 第137回日本獣医学会（東京）2004年4月
- 2) 片岡那津見、石黒直隆、前田秋彦、堀内基広：マウススクレイピーモデルを用いたプリオン蛋白質に対する宿主免疫応答の再考 第137回日本獣医学会（東京）2004年4月
- 3) 金チャンラン、堀内基広、石黒直隆、品川森一：抗 PrP 抗体による PrP^{Sc} 産生抑制機構の解析 第138回日本獣医学会（札幌）2004年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

表1. 各牛群のアリル頻度の比較

ORF内	Octarepeat (6回の有無)				234番				576番			
	n	+	-	p	n	G	A	p	n	C	T	p
ホルスタイン	863	0.94	0.06	n.s.	234	0.8	0.2	<0.01	227	0.99	0.01	<0.01
黒毛和牛	186	0.97	0.03		186	0.59	0.41		186	0.60	0.40	
健康牛合計	1049	0.94	0.06	n.s.	420	0.71	0.29	n.s.	413	0.82	0.18	n.s.
BSE感染群	6	1.00	0		6	0.75	0.25		6	1.00	0.00	

上流領域	23bp indel				12bp indel			
	n	+	-	p	n	+	-	p
ホルスタイン	204	0.16	0.84	<0.01	259	0.25	0.75	<0.01
黒毛和牛	186	0.41	0.59		186	0.43	0.57	
健康牛合計	390	0.28	0.72	n.s.	445	0.33	0.67	n.s.
BSE感染群	6	0.17	0.83		6	0.17	0.83	

n.s.: 有意差なし

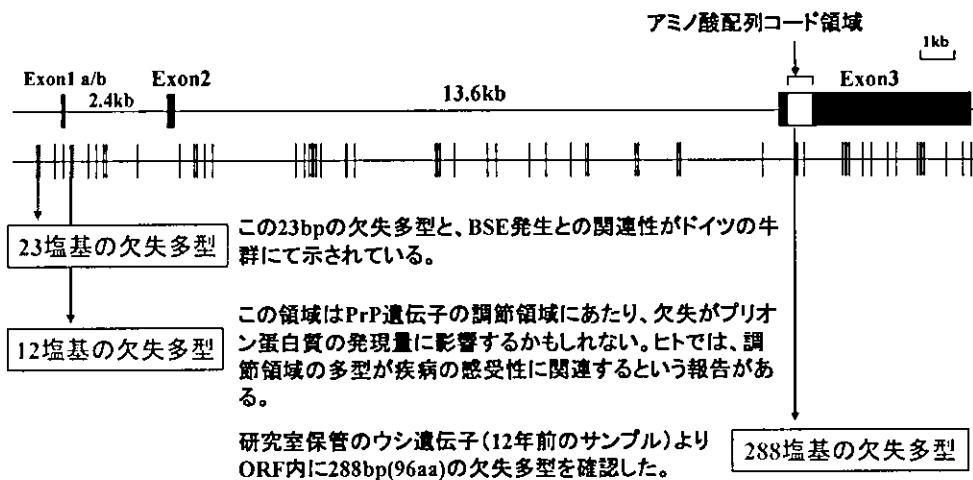


図1. ウシPrP遺伝子の構造と研究の背景

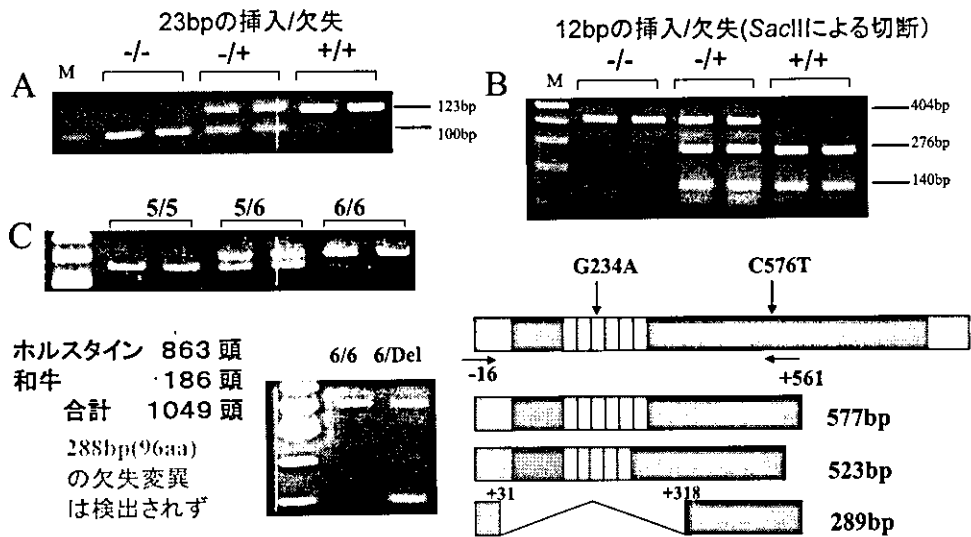


図2. PrP遺伝子上流域とORF内の多型解析

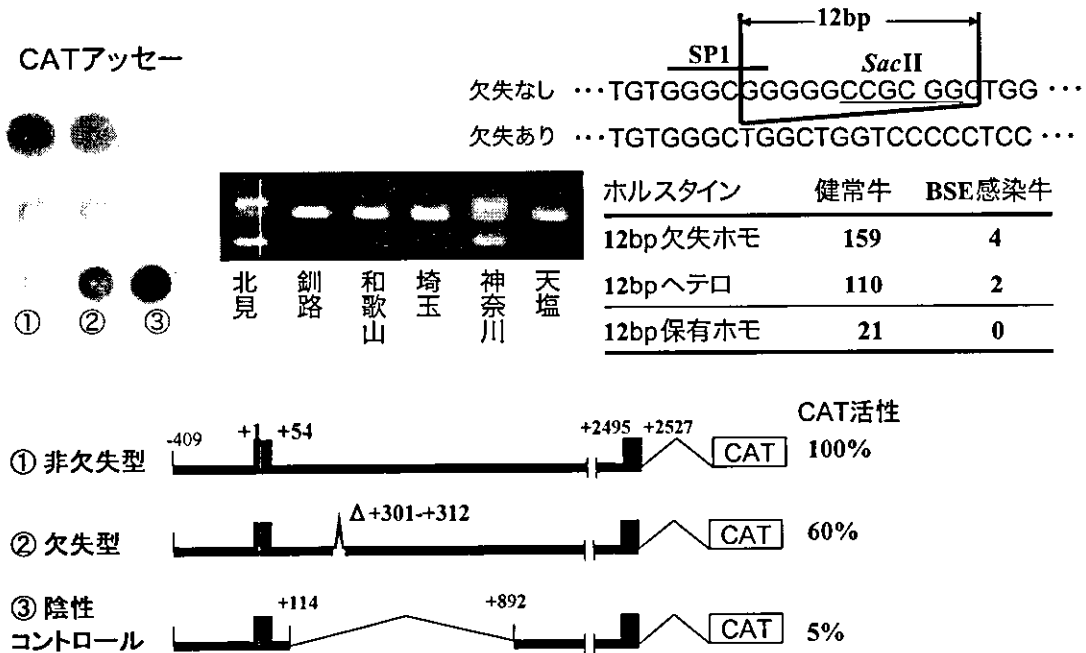


図3. イントロン1内のDNA多型(12bp挿入/欠失)と転写効率

12. 動物プリオン病の病理学的診断に関する研究 —病態形成に関与するサイトカインの探索—

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学病態獣医学講座 助教授

研究要旨 動物プリオン病の特徴的病態である PrP^{Sc} の蓄積を伴う空胞形成、アストログリアとミクログリアの活性化といった事象の形成機序の一端を明らかにすることを目的に経時的に脳内のサイトカイン発現について検討を行った。150 日前後を末期とするスクレイパー帯広株脳内接種マウスについて検索を実施した。32 種類のサイトカイン抗体を膜上に固定したサイトカインアレイを用いて経時的に検索したところ、PrP^{Sc} の蓄積に伴いおよそ 90 日頃より IL-12、MCP-1、MCP-5 といったサイトカインの発現が認められた。これらサイトカインの局在を凍結切片にて調べたところ、PrP^{Sc} の蓄積部位に一致して発現がみられた。これらサイトカインの局在は、その形態的な特徴からアストログリア、あるいはミクログリアであると考えられた。これらサイトカインは病態の進行に一致してみられること、PrP^{Sc} の蓄積部位に一致してみられることなどから、プリオン病の特徴的な病態形成に何らかの役割を果たしていることが推察された。

A. 研究目的

動物プリオン病における特徴的病変、すなわち PrP^{Sc} の蓄積に伴い空胞形成が引き起こされる機序については不明な点が多い。PrP^{Sc} の蓄積が神経毒性的に働き、アポトーシスにより神経細胞の消失がおこるとする説が *in vitro* の成績より提唱されているが、近年それに加え免疫学的機構の関与についても注目が集まっている。このことに関する研究を行うことは免疫学的な機構が病態形成にどのように関わっているのかという点を明らかにするばかりでなく、経時的な発現状況を探索することで生前診断のためのマーカーとなりうるような特異的なものが見つかる可能性があること、さらには病態形成にいたる免疫学的なカスケードを途中で阻害することで病態の進行を緩やかにするといった可能性を模索する上でも意義のあることのように思えた。

そこで、本研究ではアストログリアとミクログリアの活性化についての意義を含め、病態形成機序の一端を検索することを目的として、動物プリオン病の中樞神経系に起こっている事象について、経時的にサイトカインの発現状況について検索を行ったのでその概略を報告する。

B. 研究方法

おおよそ 150 日を末期とするスクレイパー帯広株、および対照としてマウス正常脳乳剤を用い、

接種後 10、30、60、90、120、150 日ごとに採材を行った。帯広株接種マウスではそれぞれ 4 匹、正常脳乳剤接種マウスについてはそれぞれ 2 匹のマウスを用い、病理形態学的検索のためのホルマリン固定材料およびサイトカイン検索のための凍結材料を採取した。また、剖検時にはそれぞれ採血を行い、血清の分離を行った。

ホルマリン固定後、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切標本を作製した。標本は脱パラフィン後、135°Cオートクレーブ 20 分 (135DWHA) の前処理後、PrP^{Sc} の検索のために B103、43C5 抗体を用いて免疫組織化学的染色を実施した。また、アストログリアの検索のために GFAP、ミクログリアのために RCA-1 レクチンをそれぞれ用いて免疫組織化学的染色を実施した。

経時的に採材した血清、および凍結材料の一部については破砕しその上清について、32 種類のサイトカイン抗体を吸着させた市販のサイトカインアレイ (Ray Biotech Inc.) 上で免疫反応を実施した。

また、10 μm の凍結切片を作製し、IL-12p70、IL-12p40、MCP-1、MCP-5 抗体を用いて免疫染色を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

脳内接種後 10 から 60 日目までは免疫組織化学的に脳組織に著変は見られなかった。接種後 90 日目より脳組織において免疫組織化学的染色により PrP^{Sc} の検出が可能であった。この時点で、明らかな空胞形成は組織学的には見いだすことはできなかったが、PrP^{Sc} の蓄積部位に一致してアストログリアとミクログリアの活性化が軽度ながら観察された (図 1)。PrP^{Sc} の蓄積、アストログリア、ミクログリアの活性化はその後接種後日数の経過とともに強くなった。

32 種類のサイトカインのうち、90 日より IL-12 の発現がみられ、120、150 日と経過に従いシグナルの増強が得られた。MCP-5 の発現は 120 日目にみられ、150 日目では強いシグナルがみられた。MCP-1 は 150 日目で弱いながらも発現がみられた (図 2)。血清についてはいずれのサイトカインについても発現はみられていない。

凍結切片によるサイトカインの免疫組織化学的染色では接種後 150 日マウスの脳組織において PrP^{Sc} の蓄積部位に一致して、IL-12、MCP-5 陽性細胞が観察された。MCP-1 については免疫組織化学的陽性結果を得られなかった。IL-12 陽性細胞は放射状にひろがる細胞突起を有するアストログリア様を呈するのに対して、MCP-5 では核周囲のわずかな細胞質が陽性を示した (図 2)。

D. 考 察

スクレイピー感染マウス脳においていくつかのサイトカイン、あるいはケモカインの高発現が報告されている。その一方で、それらサイトカインの一部についてはその発現に否定的な報告もなされ、病態の形成にどのようなサイトカインが関わっているのかについては議論がある。

スクレイピー帯広株では接種後 90 日目より脳組織における PrP^{Sc} の蓄積、アストログリアとミクログリアの活性化に伴い定性的なサイトカインアレイにより IL-12p70、IL-12p40、MCP-1、MCP-5 の発現が確認された。さらに免疫組織化学的にも IL-12、MCP-5 が PrP^{Sc} の蓄積部位に一致して、発現が確認されたことから、これらサイトカインの病態形成への関与が確認された。

IL-12 はナイーブ CD4⁺T 細胞からの Th1 細胞への分化誘導を促し IFN- γ 、IL-2 などの産生、これらにより次のステップとしてマクロファージの食能が亢進する。しかしながら、本研究ではこの IFN- γ 産生も IL-2 の産生もサイトカインアレイ

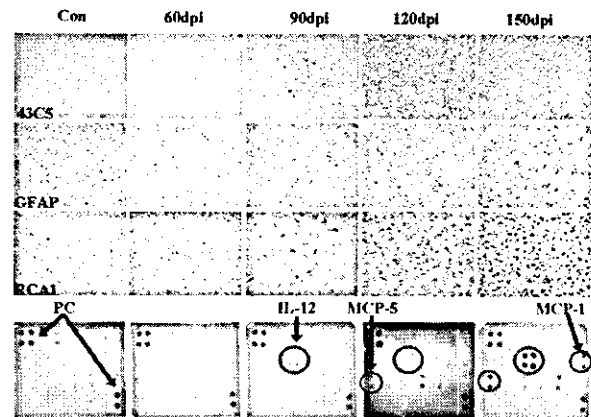


図 1

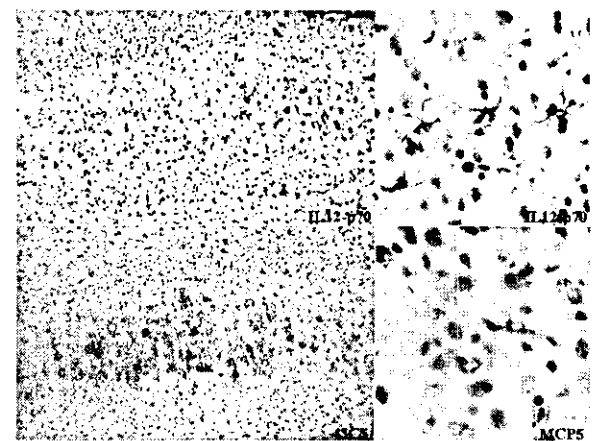


図 2

上ではみられていない。一方、スクレイピー感染マウスでは、免疫組織化学的に CD8⁺T 細胞の浸潤が報告されているものの、CD4⁺T 細胞の浸潤については否定的である。このことから、IL-12 に誘導される Th1 サイトカイン産生により惹起されるオリゴグリア細胞死による脱髄性疾患などの病態形成機構とは明らかに異なるものと推察された。

神経系ウイルス感染症ではケモカインの上昇が報告されている。その役割としては、神経組織のアポトーシスからの保護、あるいはアストログリアやミクログリアといった脳構成細胞の刺激あるいはマクロファージの誘導による病態形成が推察されている。スクレイピー感染マウスでの発現は比較的病末期であることから、病変形成に伴う宿主の単なる反応性変化である可能性は否定できないが、病態の進行になんらかの役割を果たしているものと推察される。

E. 結 論

スクレイピー帯広株感染マウスにおいて 32 種類のサイトカインのスクリーニングを実施した

ところ、IL-12、MCP-1、MCP-5 の発現が見られた。複雑な脳内サイトカインネットワークの一端をみているものと思われるが、PrP^{Sc}の蓄積部位に一致してみられることから、病態形成に関与している、あるいは組織障害を限局させるような調節機構の一端を担っている可能性が考えられた。また、サイトカインの発現がグリア成分に一致してみられることから、アストログリオシスやミクログリアの活性化といった事象は免疫学的機構の一端を担っている可能性が推察された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T. Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol (Berl)* 2004 Dec 22; [Epub]

2. 学会発表

なし

A. 知的財産権の出願・登録状況

なし

13. ウシ海綿状脳症の感染・発症機構の解明 -マイクロアレイによる早期診断および感染・発症機構の解明-

分担研究者 三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科 助教授

研究要旨 プリオン病の早期診断および感染・発症機構を解明する目的で、異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の増幅およびその阻害に関わる分子の情報を収集するために、プリオン持続感染マウス神経芽細胞腫株 ScN2a をコンゴレッド (CR) を用いて治療しマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを実施した。検索した 10000 遺伝子のうち顕著に変動した 96 遺伝子は、炎症や免疫反応、グリア細胞及びアストロサイト系の活性化に起因するものは少なかったが、昨年度報告した感染初期に脾臓や脳で見られたプロファイルとの共通性も少なく、PrP^{Sc} の増幅機序と CR によるその阻害機序との相違を示唆した。

A. 研究目的

プリオン病の患者や患者は、臨床症状及び死後の病理検査などにより PrP^{Sc} を検出することで(確定) 診断されている。まだ有効な治療法はないが、将来は早期診断を行い、他の脳神経変性疾患等と鑑別する必要がある。また、生存中に患者を診断できれば PrP^{Sc} による環境汚染を防ぎ、感染源の拡大を抑制できる。しかしながら、プリオン病原体は PrP^{Sc} 自身であることから、病原微生物を原因とする感染症と異なり PCR を利用できず、同時に免疫反応も顕著でないことから殊に家畜では生存個体レベルでのプリオン病診断は困難である。

昨年度の研究では、少なくとも感染初期には PrP^{Sc} の増幅を含めて生体側が特異的な反応を示すことを仮定して、マイクロアレイにより、PrP^{Sc} 接種したマウスの血液中の細胞および脾臓、脳などで網羅的・包括的に遺伝子の発現を解析し、プリオンの伝播・プリオンタンパク (PrP^C) の異常化に伴う特徴的なプロファイル調べた。今回、CR 存在下で培養することにより ScN2a を治療し、PrP^{Sc} の産生阻止に伴う特徴的な発現遺伝子プロファイリングを試みた。以上により、PrP^{Sc} への構造変換・増幅、及び培養細胞の治療に関与する分子の情報を収集し、早期診断や発症機構の解明、治療の標的分子を探索する。

B. 研究方法

2.5 µg/ml CR 存在下で 14 日間培養し、CR 除去後 14 日間経過してもウエスタンブロット法で PrP^{Sc} が検出されないことを指標に持続的な治療効果を確認した ScN2a あるいは対照の N2a (ScN2a の由来細胞株) から抽出した mRNA 及び Laser

Techno Mouse 10K oligo DNA microarray を用いて遺伝子の発現を解析した。標準化したデータから、PrP^{Sc} を産生するか否かの因子 1 (ScN2a vs N2a) および CR 治療を施したか否かの因子 2 (CR 投与 vs 非投与) を同時に考慮に入れた二元配置分散分析 (2-way ANOVA) により、各々 ScN2a vs N2a あるいは CR 投与 vs 非投与群で発現の差が有意 ($p < 0.05$) である遺伝子を選び、更に、ScN2a-CR 投与 vs 非投与および N2a-CR 投与 vs 非投与、CR 投与 -ScN2a vs N2a、非投与 -ScN2a vs N2a に分類して明らかに 2 倍以上の変動を呈した遺伝子を抽出した。次に、ScN2a および N2a 間あるいは、CR 投与および非投与間での (非) 共通性に基づき遺伝子を分類した。

C. 研究結果

「CR 非投与の際 N2a を対照として、PrP^{Sc} を増幅する ScN2a で発現の変動する遺伝子」と「治療前を対照として、CR 治療によって PrP^{Sc} が検出されなくなった ScN2a で発現が変化した遺伝子」と重複する遺伝子を抽出することにより、PrP^{Sc} の増幅及び CR 治療によるその阻害に関与する分子についての情報収集を試みた。その結果、捕捉された 96/10000 遺伝子は、同様に従来の接種実験での脳の遺伝子発現プロファイルとは明らかに異なるが (表 1)、昨年度の接種実験で選抜された 30 遺伝子との間にも共通性はなく、10 及び 30 日後の脾臓で共通して発現変動を示す 201 遺伝子に範囲を広げた場合は 6 遺伝子 (Ran binding protein 17 および Muts homolog 5、cDNA clone homolog to etaa16 protein、Protocadherin 8、Homolog to hypothetical 55.4 kda protein、Actin related protein 2/3 complex、subunit 1a) と重複した。なお、転

写レベルに関する限り PrP^Cの発現は、ScN2a では N2a の 56%程度であるが、CR 治療による影響は受けなかった。一方、CR 治療により N2a では PrP^Cの転写量は半減した。

表 1. PrP^{Sc}の増幅及びCR 治療による阻害に関与する遺伝子とそのカテゴリー分類

Membrane、 Plasma membrane	26
Raft	1
Chaperon activity	1
HSP	1
Golgi apparatus	1
Lipid binding、 metabolism	1
Proteolysis	3
Cell adhesion	6
Matrix	2
Complement	1
Cytokine	1
Cell growth and maintenance	40
Signal transduction	9
Cell communication	16
Metabolism	24
Cytoskeleton	3

D. 考 察

PrP^{Sc} への構造変換や種の壁に関する画期的な試験管内解析を可能にした細胞株 ScN2a は、CR 存在下で培養することにより転写レベルでの PrP^Cは変わらないが、PrP^{Sc}は検出されなくなった。期待したように、主に脳の病変に関与すると考えられるグリア細胞系及びアストロサイト系の活性化や炎症反応、免疫応答、ストレス応答に由来する遺伝子の変動は少なく、GFAP あるいは CystatinF、Vimentin、SPI-2、Cathepsin などは捕捉されなかった(表 1)。しかしながら「CR 治療による、PrP^{Sc}の増幅及びその阻害に関与する分子」を選抜したためか、マウス接種実験で絞り込んだ遺伝子群と重複するものが少ない点は CR の作用機序に起因するかもしれない。今後、さらにテンプレート数を増やし、精度および再現性の高いデータを収集する予定である。

E. 結 論

個体レベルの接種実験では、感染初期に病理変化の小さい組織の遺伝子発現プロファイリングにより、プリオンが体内に侵入した際の生体応答の中から PrP^{Sc} への構造変化と蓄積以外のものを排除できる可能性がある。また、培養細胞系による試験管内治療で得られるプロファイルと個体レベルのプロファイルの比較解析は、プリオン病の早期診断あるいは発症機構の解明に有用な臨床分子病理学的方法として更に検討する意義がある。

以上は、東北大学・村本環助教授、および九州大学・毛利資郎教授との共同研究である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu M, Furuya S, Shinoda Y, Mitoma J, Okamura T, Miyoshi I, Kasai N, Hirabayashi Y, Suzuki Y: Functional analysis of mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase (*Phgdh*) gene promoter in developing brain. *J Neuron Res* 2004, 76: 623-632.
- 2) Murakami M, Mori T, Nakagawasai O, Hagiwara K, Sakurada Y, Mobarakeh II, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Tan-No K, Yanai K, Tadano T, Iijima T: Inhibitory effect of pranidipine on N-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in mice. *Neurosci Lett* 2004, 367: 118-122.
- 3) Meng Y, Miyoshi I, Hirabayashi M, Su M, Mototani Y, Okamura T, Terada K, Ueda M, Enomoto K, Sugiyama T, Kasai N: Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson's disease, by expression of human ATP7B gene. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1690: 208-219.
- 4) Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T, Iijima T: Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res* 2004, 1024: 122-129.

2. 学会発表

- 1) 三好一郎：ヒト・プリオンに高感受性を示す遺伝子組換えマウス。東海実験動物研究会(名古屋) 2004.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

14. トランスジェニック培養細胞株を用いた感染実験解析

分担研究者 小野寺 節 東京大学大学院 教授

研究要旨 マウス、ウシ、ハムスター、ヒトのプリオン遺伝子を分離した。またI型プリオン遺伝子欠損マウスから、神経細胞株を樹立した。これらの不死化神経細胞株に対し、上記の動物のプリオンタンパク遺伝子を導入した

A. 研究目的

ウイルスを含め、病原体研究の歴史は動物を用いた研究から、*in vitro*の細胞株を用いた研究への発展が大きな流れである。従って、プリオン研究についても、動物を丸ごと用いた研究から*in vitro*への解析研究への流れが必然である。我々はこの様な観点から、プリオン感染実験において、*in vitro*へのモデル系の確立を目指す。この事は、病原体の収量がある程度得るために、動物を用いる必要が無いので、研究予算の大幅な節約が可能である。また、培養系の確立により、病原体に対する治療法の開発が可能である。同時に、プリオン持続感染細胞樹立系を目指し、病原体のより明確な解析を目指す。

B. 研究方法

- 1) レトロウイルスベクターを用いて、SV40 LargeT抗原遺伝子を導入し、神経細胞の不死化操作を行う。
- 2) I型プリオン遺伝子欠損マウス(Dopple蛋白非産生)の脳神経細胞に対して、不死化操作を行い、神経細胞株の樹立を行う。
- 3) ヒト、羊、マウス、ハムスター、牛からプリオン遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定後、レトロウイルスベクターを用いて、プリオン遺伝子欠損神経細胞株に導入する
- 4) これらの導入プリオン遺伝子が十分に発現している事を、RT-PCR、ウエスタンブロッティング、FACS、蛍光抗体法を用いて確認する。
- 5) プリオン遺伝子再発現株を用いて、病原体の感染実験を行う。BSE病原体については、一部は、米国カリフォルニア大学のDr. Prusinerと共同研究とする。ハムスター、マウス病原体については、東京大学農学部内に新たに設立される施設を用いて行う。CJD病原体につ

いては、米国カリフォルニア大学において行なう。

C. 研究結果

- 1) レトロウイルスベクターを用いた不死化操作により、プリオン遺伝子欠損細胞1型を樹立した(図1)。
- 2) これらの細胞株において、レトロウイルスベクター、pMSCV-EGFP-puroを用いて、マウスPrP遺伝子を導入した。導入した細胞株に、スクレイパーchandler株を感染させ、一過性の増殖を見た。
- 3) さらに、これらの細胞株において、レトロウイルスベクターpMSCV-EGFP-puroを用いて、ハムスターPrP遺伝子を導入した(図2、3)。導入した細胞株に、ハムスター263K株を感染させる実験を行いつつある。

D. 考察

プリオン遺伝子過発現および、PrP^{Sc}発現により、神経細胞はアポトーシスを出現した。これらの点はプリオン蛋白の配列の一部にアポトーシスを増強させる成分を含む事を示している。また、プリオン遺伝子再導入神経細胞株は、もとのマウスの野生型神経細胞株より病原体に対する感受性の高い事が明らかにされた。

E. 結論

世界で最初に不死化プリオン遺伝子欠損神経細胞株を樹立する事により、新たな動物種PrP遺伝子を有する細胞株の樹立が可能となった。また細胞障害の*in vitro*モデルも樹立された。

F. 健康危険情報

なし。

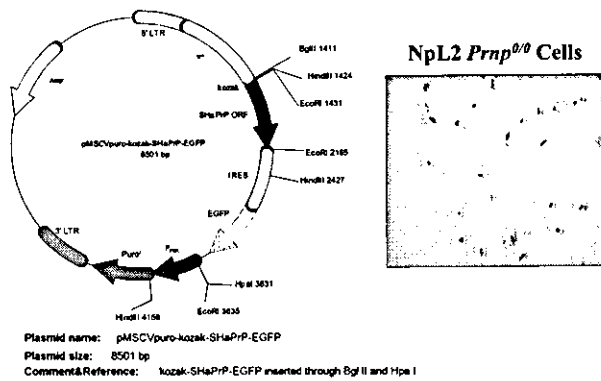


図1 The kozak-SHAPrP-EGFP was constructed into the pMSCVpuro retrovirus expression vector. This vector has been transfected into the PT67 packaging cells. Due to the growth of NpL2 cells, the infection will be performed in the first week of March.

Sequencing of Syrian Golden Hamster *Prnp* after PCR Amplification

```

-15 AAG AAT TCC GGC ACC ATG TCG ACT GAT GTT GGC CTC TCG AAG AAG GGG CCA AAG OCT GGA GGG TCG AAC ACT GGC 30
EcoRI M W T D V G L C K K R P K P G G W N T Q
81 GGA AGC CGA TAC CCG GAG CAG GGC ACC CCG GGA GGC AAC CCG TAC CCA CCG CAG GGT GGC GGC ACA TCG GCG CAA 135
G S R Y P G G G S P G G N R Y P P Q G G G T W C
136 CCG CAT CCG GGT GGC TGG GGA GAG CCG CAT GGT GCG TCG GGA GAG CCG CAT GGT GCG TCG GGT CAG CCG 210
P H G G G W G G P H G G G W G G P H G G G W G G I
211 GAT GGT GGT GGC TGG GGT CAA GGA GGT GGC ACC CAG AAT CAG TGG AAC AAG CCG AGT AAG CCA AAA ACC AAC ATG 285
H G G G W G G G G T H H G W H K P S R P R T N I
286 AAG CAC ATG GCG GGC GGT GGT GCG GGA GGC GCG GTG GCG GGC CTT GGT GCG TAC ATG CTC GCG AGT GCG ATG 360
K H M A G A A A A G A V V G G L G G Y M L G S A M
361 AGC AGC CCG ATG ATG CAT TTT GGC AAT CAG TGG GAG CAG CCG TAC CCG TCA AAC ATG AAC CCG TAC CCG AAG 435
S R P M M N F O N W E D R Y Y R E N M N R Y P I
436 CAA GTG TAT TAC CCG GCA GTG CAG CAG TAC AAC CAG AAC CAG AAT CAG CAG CAT TGT GTG AAC ATC ACC ATG 510
Q V Y Y R P V D G Y K N Q M N F V H D C V H I T
511 AAG CAG CAG ACA CTC ACC ACC ACC AAG GCG CAG AAC TTC ACC CAG ACC CAG ATC AAC ATA ATG CAG CCG CTC 585
K Q H T Y T T T K G E H F T E T D L K I M E R
586 GTG CAG CAG ATG TGT ACC ACC CAG TAT CAG AAG CAG TTC CAG GCG TAC TAC GAT GGA AGA AGG TCC ACC GCG GTG 660
V E Q M C T T O Y Q K E S G A Y Y D G R R S S A
661 GTG TTC TCG CCG CCG GTG ATC CTC ATT TCC TTT CTC ATC CTC ATG GCG TGA AAT TCC G 735
L F S S P P V I L L I S F L I F L M V Y G EcoRI
  
```

図2 The ORF of Syrian Golden Hamster *Prnp* together with two EcoRI recognizing site was amplified by PCR.

Electrophoresis of Syrian Golden Hamster *Prnp* (744bp) PCR Product

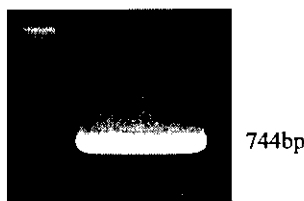


図3 Electrophoresis of the amplified sequence showed the predicted band of 744bp.

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Sugiura, K., Ito, K., Yokoyama, T., Kumagai, S., and Onodera, T.: A model to assess the risk of introduction into Japan of bovine spongiform encephalopathy agent through imported animals, meat and meat-and-bone meal. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.22:(3)777-794, 2003.
 - 2) Mange, A., Beranger, F., Peoce, K., Onodera, T., Frobert, Y., and Lehmann, S.: Alpha- and beta-cleavage of the amino terminus of the cellular prion protein. Biol. Cell 96:125-132, 2004.
 - 3) 小野寺節:牛肉のトレーサビリティシステムの確立: 食の安全性、その将来と展望、45-55、東京教育情報センター、2004.
 - 4) Shyu, W.C., Lin, S.Z., Saeki, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Onodera, T., Chiang, M.F., Thajeb, P., and Li, H.: Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. Cell. Mol. Neurol. 24:257-268, 2004.
 - 5) 小野寺節:日本・EU・米国の BSE (牛海綿状脳症)問題を比較する、食の安全性、徹底検証、東京教育情報センター、77-104, 2004.
 - 6) Sakudo, A., Yoshimura, E., Lee, D.C., Nagasaka, S., Nitta, K., Saeki, K., Matsumoto, Y., Lehmann, S., Itohara, S., Sakaguchi, S., and Onodera, T.: Prion protein suppress perturbation of cellular copper homeostasis induced by oxidative stress. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313:850-855, 2004.
 - 7) Nishimura, T., Sakudo, A., Nakamura, I., Lee, D.C., Taniuchi, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Ogawa, M., Sakaguchi, S., Itohara, S., and Onodera, T.: Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxidase level and prevents copper-induced apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 323:218-222, 2004.
 - 8) Baj, A., Bettaccini, A., Nishimura, T., Onodera, T., and Toniolo, A.: Poliovirus infection of prion-deficient neuronal cells. J. Neurovirol. in press, 2005.
 - 9) 小野寺節:人畜共通感染症としてのプリオン病、農林水産技術情報協会会報、2004.
 - 10) 小野寺節:BSE対策は成功したのか? 公衆衛生 168:500-510, 2004.
 - 11) Sakudo, A., Lee, D.C., Nishimura, T., Li, S., Tsuji, S., Nakamura, T., Matsumoto, Y., Saeki, K.,

- Itohara, S., Ikuta, K., and Onodera, T.: Octapeptide repeat region and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein (PrP) mediates PrP-dependent activation of superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326:600-606, 2005.
- 12) Sakudo, A., Lee, D.C., Li, S., Nakamura, T., Matsumoto, Y., Saeki, K., Itohara, S., Ikuta, K., and Onodera, T.: PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP deficient neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328:9-14, 2005.
- 13) Inoue, Y., Yamakawa, Y., Sakudo, A., Kunimi, T., Nakamura, Y., Matsumoto, Y., Saeki, K., Kamiyama, T., Onodera, T. and Nihijima, M.: Infection-route independent accumulation of splenic abnormal prion protein in mice. *Jpn. J. Inf. Dis.* in press, 2005.

15. 疑似患畜を用いた発症前のプリオン動態

分担研究者 扇 勉 北海道立畜産試験場畜産工学部長

研究要旨 牛海綿状脳症 (BSE) 疑似患畜 11 頭について、定期的に臨床症状の観察および血液、尿、脳脊髄液の採取を行い、異常行動・神経症状の確認、生体材料の生化学的分析を行った。BSE または中枢神経疾患を疑う症状を呈した牛はなく、鑑定殺した 9 頭については、ELISA 法による BSE 検査により、延髄門部への異常プリオン蛋白質の蓄積が無いことが確認された。またホルスタイン種子牛 21 頭を用い、脳内接種による BSE 感染牛の作出を行った。BSE 感染脳乳剤を 18 頭、BSE 陰性脳乳剤を 3 頭に接種した。現在、死亡した 3 頭を除く、18 頭について経過を観察中である。

A. 研究目的

と畜場における異常プリオン蛋白質汚染のリスクを低減するため、また、わが国における BSE の早期清浄化を達成するため、農家段階でのスクリーニング検査による感染牛の摘発が必要である。そのため、疑似患畜およびプリオンの脳内接種による実験感染牛におけるプリオン動態およびその他の生化学的指標の変化を分析することにより、BSE の生前診断の可能性を検討する。

B. 研究方法

1. 疑似患畜の経過観察

北海道猿払村および音別町の BSE 発生酪農家 2 戸から導入し、経過観察中の BSE 疑似患畜について、定期的な臨床症状の観察を行うとともに、血液、尿、脳脊髄液の採取を行い、生化学的解析を行った。また今回、中枢神経細胞損傷の指標となりうる脳脊髄液中 S-100B 蛋白質濃度について ELISA 法により分析した。

疑似患畜は、8 歳 (「牛海綿状脳症 (BSE) 検査対応マニュアル」改正による疑似患畜範囲外の牛については 7 歳) を目途に鑑定殺した。死亡または鑑定殺した牛について、ELISA 法による BSE 検査キットを用いて、延髄門 (かんぬき) 部のプリオンの蓄積を調べた。

1) 臨床症状観察

- ・ 神経症状
不安、興奮、神経過敏、歯ぎしり、耳介の位置
- ・ 姿勢・運動の異常
頭部を下げる、四肢の運動失調、震え、転倒、麻痺、横臥、旋回、ナックル

- ・ 知覚の異常

触覚、音に対する反応、耳の過剰な動き、光に対する反応

- ・ 行動の異常

移動を嫌がる、鼻や腹を過剰に舐める、頭部を擦る

2) 生体材料の生化学的検査

i) 血液

- ・ 一般および生化学検査

赤白血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板数、総蛋白質濃度、Na、K、Cl、Ca、Mg、IP、グルコース、BUN、T-chol、Alb、GOT、ALP、GGT、CPK、NEFA、TG、 β -OH、CREA

- ・ 二次元電気泳動による蛋白質解析

ii) 尿

- ・ 異常プリオン蛋白質の検出

ウエスタンブロッティング法

iii) 脳脊髄液

蛋白質濃度、グルコース、クロール、S-100B 蛋白質

○脳脊髄液からの S-100B 蛋白質 (Sandwich ELISA 法: Green らの方法)

- ・ 固相抗体: 抗ウシ S-100 β 抗体:SH-B1 (SIGMA)
- ・ 検出抗体: HRP 標識抗ウシ S-100 蛋白質抗体 (DACO)
- ・ TMB 発色により吸光度を測定

3) 死亡または鑑定殺

死亡または鑑定殺処分した疑似患畜については延髄門部を ELISA 法による診断キットを用いて、

異常プリオン蛋白質の検出を行った。また主要臓器について、凍結およびホルマリンにより保存した。

解剖は場内焼却場併設の解剖室で行い、保存臓器以外のと体はすべて場内焼却場で焼却処分した。

2. 実験感染牛を用いた生前診断法の検討

1) 脳内接種による実験感染牛の作出

北海道内で生まれ、臨床的に健康な 2~4 ヶ月齢のホルスタイン種子牛 21 頭を供試した。BSE 感染牛脳乳剤および BSE 陰性確認済み牛脳乳剤を 10%脳乳剤-PBS (-) に調整した。遠心し、細胞塊を除去した後、UV 殺菌 (4W×2.5cm, 30min) を施した。これまでに確立した脳乳剤脳内接種法により (表 1) 脳乳剤をそれぞれの子牛に 1 ml 接種した。

- 1 被験牛を、感染実験施設 (ABSL2) に搬入する。
- 2 キシラジン (0.25mg/kg) により鎮静。
- 3 頭部保定装置で手術台に頭部を保定する。
- 4 術部の消毒を行う。
- 5 角間隆起から 1 cm 鼻側、正中線から 2 cm 右側の点 (穿刺点) に印をつける。
- 6 塩酸リドカインによる局所麻酔後、穿刺部を 3cm 程度切開する。
- 7 ピンドリルを前後に垂直、やや先を正中に向け、前頭骨を貫通する。
- 8 脳幹部に向け、ゆっくり脳乳剤入り 18G カテラン針付き 1ml シリンジを挿入。
- 9 ゆっくり接種材料を半分注入し、さらに針を抜きながら残りを注入する。
- 10 針を抜く。脳脊髄液を吸引除去する。
- 11 スクリューで、前頭骨貫通孔を塞ぐ。
- 12 縫合により終了。抗生物質の全身投与。
- 13 飼育施設 (ABSL 1) に搬入する。

表 1 子牛への脳乳剤脳内接種の手順

また、作出した BSE 実験感染牛は、定期的に、一般臨床症状および神経症状の観察、血液および尿など生体材料の採材を行っている。

(倫理面への配慮)

サンプル採取および検査、死亡牛の剖検は、全牛の BSE 感染を前提として実施し、研究者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立畜産試験

場動物実験委員会に承認された実験指針に従って行った。感染性試料および感染動物の取り扱いには、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

C. 研究結果

1. 疑似患畜の経過観察

2004 年 2 月現在、本試験で導入した 18 頭の疑似患畜からは、異常行動や神経症状を呈するなど、BSE 発症を疑う牛はいなかった。

本年度に鑑定殺を行った 9 頭は、ELISA 法による延髄門部を用いた BSE 検査で全頭陰性であった。

血液および血清生化学分析項目は概ね基準値で推移した。血漿における蛋白質二次元電気泳動による解析は観察途中から出現するスポットが存在した。また、脳脊髄液の生化学検査および脳脊髄液 S-100B 蛋白質濃度においては一時的な高値を示す個体があった。

2. 脳内接種法による BSE 感染牛の作出

2004 年 1 月より 9 月までに、供試した子牛 21 頭に BSE 感染脳乳剤および陰性脳乳剤を 1 ml 脳内接種した (表 2)。

21 頭のうち 1 頭は、接種翌日から衰弱し、低体温、起立不能を呈し 3 日後に死亡した。

20 頭については、中枢神経症状および顔面や四肢の麻痺等は見られなかった。

由来	部位	接種頭数
英国輸入	脳幹部	6
国内患畜 A	小脳	5
国内患畜 B	視床	5
国内患畜 C	大脳	2
BSE 陰性牛	延髄	3

表 2 感染試験に用いた材料と接種頭数

D. 考察

1) 疑似患畜の経過観察

2005 年 2 月現在、導入した疑似患畜からは BSE の感染を疑う個体はなく、患畜に同居した経歴のあるこれらの疑似患畜を用いた BSE の生前診断法の検討や病態解明は困難であった。本試験は、これらの疑似患畜を患畜摘発時よりもさらに飼育した国内での最初の試験で、異常プリオン蛋白質の蓄積や発症に必要であると思われる十分な

期間の観察を行った。英国においても同居牛の BSE 感染率は低く、国内においてもこれまで疑似患畜の感染は皆無である。しかしながら疑似患畜は BSE 患畜と疫学的な関連性が高く、また BSE の感染経路や発症機序が明らかでないことから、疑似患畜の BSE 感染について、今後も精査する必要があると思われる。BSE および中枢神経疾患の牛はいなかったが、S-100B 蛋白質の一時的な高値を示す個体があった。牛の脳脊髄液中 S-100B 蛋白質濃度の経時的変化に関する報告はなく、BSE の診断指標としての応用には、BSE 非感染牛の生理的变化についてもさらに検討する必要があった。

2) 脳内接種による BSE 感染試験では、21 頭中 20 頭で接種による影響を見なかったことから、本法は事故率が低く、迅速（1 頭に約 20 分間）に行うことのできる方法であった。死亡した 1 例の死因は不明である。臨床症状から脳組織の損傷または血管損傷による頭蓋腔内出血などが考えられる。2005 年 2 月現在、BSE を接種した子牛は、臨床症状などから、BSE の発症を疑う所見は得られていない。

E. 結論

1) 今回導入した疑似患畜は、異常プリオン蛋白質の蓄積は無く、BSE に感染していないと考えられた。BSE 疑似患畜は疫学的な関連性が高く、公衆衛生上精査する必要があるが、BSE 感染モデルとしては、発症する確率が低く適当でないと思われた。

2) 脳内接種による BSE 実験感染をホルスタイン種子牛 21 頭に行った。接種の影響と思われる死亡例が 1 例あったが、20 例では臨床上的影響がなかった。

現在、肺炎で死亡した 2 例を除く 18 頭を飼育・観察中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

Fukuda S et al. The development of the intracerebral inoculation method and BSE experimental transmissions to calves. International symposium of prion diseases in Sendai, Japan. (2004. 11. 1)

16. カニクイザルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発

分担研究者 寺尾 恵治 国立感染症研究所筑波霊長類センター
研究協力者 小野 文子 社団法人予防衛生協会

研究要旨 幼若カニクイザルに BSE 感染ウシ脳乳剤を接種し、経時的に血液、脳脊髄液、尿および、血液の採材を行うとともに、行動および神経機能解析を行った。国内で発症したウシ脳乳剤を経口接種 3 頭、脳内接種 3 頭および、無接種対照 1 頭の計 7 頭について上記検索を継続して行っている。接種後 15 ヶ月目において、行動観察で律動運動の多動性、旋回運動の頻度が高い傾向が認められた。非律動運動では非特異的な眼球振動や搔痒感が観察された。指迷路試験で評価する高次脳機能では、成功率に著しい変化はなかったが、一部の個体で 4 段迷路の課題解決までの時間が延長していた。アップルテストでは著しい変化がないことから、上記遅延は報酬獲得戦略の思考がやや変化している可能性を示唆していることが推測された。皮質脳波では 6 頭中 3 頭において脳波の高振幅徐波が多発する傾向が認められ、誘発脳波においても同個体においてわずかな振幅低下と潜時の延長が認められた。今後行動様式の解析を詳細に行うとともに、脳波について詳細な周波数解析を行うことにより、発症初期の異常の抽出を行っていく予定である。

キーワード：カニクイザル、BSE、変異型 CJD、
高次脳機能評価

経口投与（脳乳剤 2.0ml）	3 頭
脳内接種（脳乳剤 0.2ml）	3 頭
無処置対照	1 頭

A. 研究目的

カニクイザルを用いて BSE プリオン（BSE-P）感染モデルを作成し、変異型 CJD の病態解明および早期診断法を確立することにより人の診断・治療法の確立に資することを最終目的とする。あわせて、BSE-P 接種後経時的に採取した血液、髄液、主要組織を研究班共通の研究資源とすることも目的とする。変異型 CJD 患者では行動異常、記憶力低下とともに孤発型 CJD 患者とは異なる脳波の変化が生じることが報告されている。今年度は、BSE-P 接種後一年を経過したカニクイザルについて行動解析、記憶能解析および脳波測定を経時的に実施し、発症に伴う高次脳機能の変化を調査した。

B. 研究方法

1. 実験群

1 歳齢の育成雄カニクイザル 6 頭を下記の 2 群に分け、BSE 発症したウシの 10%脳乳剤を、それぞれの経路で投与した。また、コントロールとして 1 頭を無処置対照群として同様の検索を行った。

2. 調査項目：

投与前後に以下の調査を 1～3 ヶ月毎に実施した。

- 1) 行動解析（1 ヶ月毎）
指定行動観察・ビデオ撮影
アップルテスト（行動評価）
- 2) 記憶能解析（1 ヶ月毎）
指迷路試験・ビデオ撮影
- 3) 神経機能解析（3 ヶ月毎）
大脳皮質脳波
視覚、聴覚、体性感覚誘発電位
- 4) 定期的採材項目（3 ヶ月毎）
血液、尿、髄液

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、トレイ上に等間隔で置かれた 4 個の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し、報酬をつかみ取るまでの時間を計測した。

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便におこなう装置であり、4 段の指迷路装置内に置かれた報