

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の 感染・発症機構に関する研究班

平成14－16年度 総合研究報告書

平成17年3月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所感染病理部)

食品の安全性高度化推進研究事業
「プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究」
班員名簿

氏 名	所 属	職 名
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部 長
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座	教 授
品川 森一	動物衛生研究所プリオン病研究センター	センター長
山河 芳夫	国立感染症研究所細胞化学部	室 長
松田 治男	広島大学大学院生物圏科学研究科	教 授
千葉 丈	東京理科大学基礎工学部生物工学科	教 授
田村 守	北海道大学電子科学研究所超分子分光分野	教 授
堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科創生応用医学センター	教 授
菊池 裕	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部	主任研究官
松田潤一郎	国立感染症研究所獣医科学部	室 長
石黒 直隆	岐阜大学応用生物科学部食品環境衛生学教室	教 授
古岡 秀文	帯広畜産大学畜産学部獣医学科病態獣医学講座	助教授
三好 一郎	名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター	助教授
小野寺 節	東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学教室	教 授
扇 勉	北海道立畜産試験場畜産工学部	部 長
寺尾 恵治	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター	センター長
高橋 秀宗	国立感染症研究所感染病理部	室 長
佐々木裕之	埼玉県中央食肉衛生検査センター	所 長

目 次

- I. プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究
総合研究報告書（平成 14-16 年度）・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

- I I. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

1. 総合研究報告書

プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究

主任研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究要旨：本研究班では、(1)プリオンの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことを目的とした。研究の主な結果は下記の通りである。

①BSE 確認検査で用いるウエスタンブロット法および病理・免疫組織化学法を確立し、さらに改良を加え、世界でもほぼ一流の検査法として完成させた。

②わが国で摘発された BSE 例の延髄組織、多くの組織が採材できた 3 例について病理・免疫組織化学、およびウエスタンブロット法でプリオンの分布を明らかにした。また 6 頭についてはマウスへの伝達が陽性となった。残りは実験中である。

③わが国で脳組織が得られた BSE3 例からはほぼ均質な 10% 乳剤を作製し、性状解析し、参照品を作製した。これを用いて ELISA 法の評価が可能となった。また牛、サル、Tg マウスへの接種実験に使用した。プリオンを接種した牛やサルは経過観察中である。

④ウシプリオン発現 Tg マウスの 4 系統のうち、Tg#39 マウスでは接種後約 100 日で脾臓に、200-300 日で脳にプリオンが検出できたが、脳のプリオン量は少なかった。検出感度は ELISA 法の 80 倍であった。

⑤マウス-ハムスター PrP のキメラマウスへの伝達試験により、BSE のハムスターに対する種の壁に関与するプリオン遺伝子の領域を同定した。

⑥マウスおよびニワトリの新規抗プリオン抗体を開発し、性状解析を行った。

⑦コンパクトな蛍光相関分光法測定装置が完成し、自動計測システムの試作が完了した。さらに高感度化が可能な蛍光相互相関法の導入をおこなった。

⑧牛、ヒツジやヤギのプリオン遺伝子の多型を明らかにした。BSE 6 例については特徴的な変異や欠失はみられなかった。

⑨抗プリオン抗体のパネルを用いてプリオン分子の構造および性状を解析した。また液化エチレンオキサイド処理によりアミノ酸修飾がおこること、および高圧熱処理では加水分解がおこることが不活化の機序に関与していると考えられた。

⑩プリオンの複製増殖に関与する補助因子の同定を目指して RNA 干渉による遺伝子スクリーニングを行い、8 個の遺伝子に絞ることができた。

⑪プリオン病の早期診断および感染・発症機構の解明を目的として、マイクロアレイによりプリオン接種マウスおよびプリオン発現培養細胞で発現遺伝子プロファイリングを行った。共通した遺伝子は検出できなかった。

⑫プリオンノックアウトマウスから神経細胞株、神経幹細胞を樹立し、プリオン遺伝子導入を行い、外来性プリオンの増殖が観察された。

⑬GFAP を指標として屠畜時の脳・脊髄組織による食肉汚染について検討した。ピッシングやスタンニングによる血液への神経組織の混入についてはすべて検出限界以下であった。と畜場における洗浄後の牛枝肉、カット工場処理された牛ブロック肉の表面から GFAP が検出され、脳・脊髄組織が残留しているものと思われた。市販牛肉は、不検出であった。背割り法や洗浄法について再検討が必要と考えられた。

分担研究者（17名）

古岡 秀文 帯広畜産大学病態獣医学講座・助教授
堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科・教授
品川 森一 動物衛生研究所プリオン病研究センター・センター長
石黒 直隆 岐阜大学食品環境衛生学教室・教授

松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科・教授
千葉 丈 東京理科大学基礎工学部・教授
田村 守 北海道大学電子科学研究所・教授
堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科・教授
菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物

部・主任研究官

山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部・室長
三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科・助教
松田潤一郎 国立感染症研究所獣医学部・室長
小野寺 節 東京大学大学院・教授
高橋 秀宗 国立感染症研究所感染病理部・室長
扇 勉(森 清一) 北海道畜産試験場畜産工学部・部長
寺尾 恵治 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター・センター長
佐々木裕之(沢谷広志) 埼玉県食肉衛生検査センター・所長

A. 研究目的

平成 13 年 9 月に日本ではじめて牛海綿状脳症(BSE)例が発見され、食肉の安全を図るために食肉衛生検査所で全頭検査が始まった。平成 17 年 3 月までに計 11 頭が摘発され、端緒となった 1 例と最近までの死亡牛検査で計 4 頭が農水省の家畜保健衛生所で発見され、わが国では現在、15 頭の BSE が見つかっている。近年、英国の BSE 例は著明に減少し、ほかのヨーロッパ諸国でも大方は減少しているが、いまだ問題となっている国もある。一昨年から昨年まで BSE 例はカナダで 3 例と米国でも 1 例が摘発され、アメリカ大陸での BSE が問題となりつつある。BSE が原因と考えられるヒトの変異型クロイツフェルドヤコブ病(vCJD)は、わが国では平成 17 年 2 月に英国での曝露と考えられる 50 才台の邦人男性例が診断された。英国等世界では現時点で計 169 例見つかっており、食品や輸血分野のみならず、BSE 等のプリオン感染症対策は緊急的重要課題である。

本研究では、(1)プリオンの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品等のプリオン汚染評価方法の検討やプリオン不活化法および検証方法の開発等、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行う。そのためには、正常型および異常型プリオン蛋白質の相違とプリオンの動物体内増殖機構、プリオン病に対する感受性、そして発症機構を明らかにする目的で、基礎および応用面から共同して総合的に研究を行う。これらを通して、プリオンの免疫化学的、病理学的およびバイオアッセイによる検査法、プリオン不活化法、と畜法の改良等、食品分野における牛海綿状脳症対策に役立つ具体的方法を開発し、わが国の食品の安全性を向上させ、変異型クロイツフェルドヤコブ病の発生対策に資する

ことを目的とする。

B. 研究方法

BSE プリオンはバイオセーフティレベル 2 の病原体で、BSE プリオンをウシプリオン遺伝子改変マウスやサルで増殖させる実験の場合はレベル 3 としている。農水省の大型実験動物感染実験では、ウシへの BSE プリオン脳内接種はレベル 2 で、体内感染であるため 1 ヶ月後にはレベル 1 となり、発症後の剖検はレベル 3 となるという。各分担研究者の所属する施設でプリオンを取り扱えるレベルの実験室は整備されていない場合もあるので、共同研究が必要となる。また、プリオンの感染性や伝達性の最終評価はマウス等の実験動物を必要とする。ウシ遺伝子改変マウスや BSE ウシ検体、BSE 実験感染ウシ検体、そして霊長類を用いた感染実験材料は研究班内の共通研究資源とし、分担研究者の実験研究に役立てることで研究を加速する。実際、抗プリオン抗体や BSE 脳乳剤の提供、病理、ウエスタンブロット、そして Tg マウス解析などの共同研究が行われた。種のバリエーションがあるため実験動物の発症には通常 1 年以上の潜伏期間を要する。それぞれの詳細な研究方法是分担研究者の各年度の分担報告書に譲る。

本研究班の 3 つの柱と 3 年間の研究課題および担当者を以下に示す。

1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発：

プリオン特異抗体の開発と検討(松田治、千葉)、病理組織での検出方法の検討と解析(佐多、堂浦、堀内)、プリオン蛋白質検出のための ELISA 法およびウエスタンブロット法の検討と解析(山河、堀内)、蛍光相関分光法を利用した新しい検査法の開発(田村)、標準陽性サンプルの開発とプリオン遺伝子発現(菊池)、また検討材料としてのプリオンは感染牛由来および遺伝子改変マウスで作製しプリオン株として供給する(佐多、山河、松田潤)。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明：

近交系マウスおよび Tg マウスを用いた解析(品川)、遺伝子改変マウスによるバイオアッセイ系の開発(松田潤)、マウスや牛、サル等の実験動物モデルの作製(高橋、扇(森)、寺尾)と解析(山河、佐多)、スクレイピー脳病理変化の解析(古岡)、プリオン感受性解析を目的とした牛とヒツジの PrP 遺伝子型の検討(石黒)、プリオン蛋白質の構造変化の解析(堀内)、プリオン接種マウスおよび産生細胞でのマイクロアレイ法に

よる遺伝子解析（三好）、プリオン増殖に關与する補助因子の解析（堂浦）そしてプリオン病病態解析を目的とした培養細胞系の開発（小野寺、高橋）により行う。

3) 食品の安全性を因るために食肉の処理方法の検討：

前述した検査や病態解析結果を食品分野で検証し応用するに食肉衛生検査所における実際的な検討が不可欠であり、全国食肉衛生検査所協議会の会員に協力を求める。屠畜時のスタニング、ピッシングによる血液への神経組織の混入、GFAP を指標とした食肉汚染状況および総合的な検討で、有効な食肉汚染防止法を開発する（佐々木、沢谷）。

（倫理面への配慮）

動物実験は各施設の動物実験委員会の承認をえて、動物実験指針にもとづいて行う。「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、実験動物の使用を最小限にするとともに、取り扱いや処理には動物愛護の精神を持って臨む。またプリオンの取り扱いは、国立感染症研究所におけるバイオセーフティー安全管理規定を遵守し、国際的な基準にも十分に配慮する。

C. 研究結果

1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発

- ① BSE 確認検査のうち病理・免疫組織化学法を確立しマニュアル化した（佐多、古岡）。ウエスタンブロット法についても同様に確立した（堀内、山河）。またウエスタンブロット法を高感度化し、非定型 BSE 例が診断できた（山河）。免疫組織化学法における抗原賦活化法を改良し、新規高感度化法を開発した（堂浦、古岡）。7 時間で終了する迅速病理検査法を開発し、実際の確認検査等の検体で評価した結果、使えることが判明した。また新規の高感度免疫組織化学法 immuno-AT tailing 法を開発し、さらに検討中である（佐多）。
- ② BSE 全頭検査による摘発ウシの延髄組織について検討し、BSE の初期では迷走神経背側核が強く侵され、ついで知覚核や中継路核に広がり、運動核は軽度であることが明らかとなった（古岡）。BSE 陽性牛の全身組織採材が可能であった 2 例について病理免疫組織化学的に検討し、神奈川例では大脳基底核、皮質、小脳、脊髄、回腸末端部、神経節に、和歌山例では大脳、小脳、脊髄にプリオンが

検出された（佐多）。同様にウエスタンブロット法で神奈川例について検討したところ、大脳、小脳、脊髄、回腸遠位部、神経節みられ、これらの相対的沈着量を明らかにした。また延髄組織では検査に使用した門部分に強くみられ、ほかの部位ではほとんど認められなかった（山河）。

- ③ わが国で脳組織が得られた BSE3 例からほぼ均質な 10% 乳剤を作製し、性状解析し、研究に必要な各分担研究者に提供した。またわが国で市販されつつある ELISA キット 2 種について同じ乳剤を用いて評価し、現在使われているプラテリアとほぼ同等の検出感度があることがわかった。確認検査に使われているウエスタンブロット法の検出感度は ELISA 法の 50 倍程度であることが判明した。神奈川 BSE2 例目の末梢神経組織から PrP^{SC} が検出でき、その程度は脊髄の 1/1,000-1/3,000 と考えられた。また背根神経節には脊髄の 1/10 程度の PrP^{SC} の蓄積があった（山河）。この背根神経節のほとんどに外套細胞および神経節細胞に沈着したプリオンを免疫組織化学で検出できたが、末梢神経は陰性であった（佐多）。
 - ④ 高親和性抗プリオンタンパク質抗体を作製するため DNA 免疫法を開発し、モノクローナル抗体を作製した。繰り返し配列にあるエピトープを認識し、神経細胞膜上の PrP^{SC} を認識するが細胞質内の PrP^{SC} は認識しなかったため、細胞質内ではこのエピトープを欠く PrP^{SC} の存在が明らかとなった（千葉、堀内、山河、佐多）。
 - ⑤ ニワトリの抗プリオンモノクローナル抗体が BSE プリオンと特異的に反応すること、ファージで作製した抗体を二価化すると著しく高い反応性を有することを確認した（松田治）。
 - ⑥ コンパクトな蛍光相関分光法測定装置が完成し、自動計測システムの試作が完了した。さらに高感度化が可能な蛍光相互相関法の導入をおこなった（田村）。
 - ⑦ 培養細胞からの標準陽性サンプルの開発はできなかったが、この細胞でのプリオンタンパク質の発現解析から新たな PrP 発現機構の存在が示唆された（菊池）。
- ### 2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明
- ① わが国で初めて発見された BSE 千葉例のプリオンを近交系マウスに接種した結果、継代

5代目で潜伏期間が約400日から160日まで短縮できた。BSEプリオンのウエスタンプロットのパターンは保たれ、英国例と類似していた。と畜検査で摘発されたBSE1頭目から6頭目については、脳内接種してから415日から約500日後に発症し死亡した。米国から輸入したウシ遺伝子改変マウスでの感染実験の結果、およそ240日で発症した。ほかの国内BSE例については実験継続中である(品川、堀内)。

- ② またマウス-ハムスターPrPのキメラマウスへの伝達試験により、BSEのハムスターに対する種の壁に関与するプリオン遺伝子の領域を同定した(品川)。
- ③ ウシプリオン発現Tgマウスを4系統作出し、遺伝子導入部位を同定した。Tg#39マウスでは接種後約100日で脾臓に、200-300日で脳にプリオンが検出できたが、脳のプリオン量は少なかった。このマウスでは最低感染重量は1.25 µgで、和歌山例の10%脳乳剤1mlには 8×10^4 感染価のプリオンがあることがわかった。バイオアッセイ系としての検出感度はウエスタンプロット法に匹敵し、現行ELISA法の約80倍の感度を持つと考えられた(松田潤、山河、高橋、佐多)。
- ④ 2004年1月から9月までにBSEプリオンを脳内接種した18頭の牛を経過観察中である。また疑似患者のうち9頭を鑑定殺したが、プリオンは検出できなかった。また血液や髄液の検査では異常値はえられなかった(扇)。
- ⑤ カニクイサルへの接種実験では、接種後3ないし6ヶ月後ではプリオンの沈着はみられなかった。現在、経口接種3頭、脳内接種3頭について経過観察しているが、15ヶ月後で軽度の行動異常がみられ、脳波所見にも軽度の異常が見られるようになった。対照と比較すると、接種群では体重増加率が低い傾向がみられた(寺尾)。
- ⑥ ヒツジでは171番アルギニンをもつ個体が41/117頭、ヤギでは7カ所に変異が観察された。スクレイピー感受性を示す136番バリンをもつものは少なかった。ウシのPrP遺伝子多型についてホルスタイン863頭、黒毛和牛186頭で検討した。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。わが国のBSE牛6頭では、特異的な変異部位はなく、Exon 1近傍の変異箇所についても大きな特徴は見出されなかった(石黒)。

- ⑦ スクレイピーマウスの空胞変性、プリオンの蓄積、グリア細胞の活性化機構についてサイトカインの動態を調べた結果、IL-12, MCP-1, MCP-5が脳組織から検出でき、免疫組織化学でも病変部に一致して発現が確認でき、これらサイトカインの病態形成への関与が示唆された(古岡)。
- ⑧ 10種類のモノクローナル抗体パネルを使い、スクレイピーマウス脳精製PrP^{Sc}やN2Aマウス神経芽腫細胞を用いてプリオン分子の構造および性状解析した。Proteinase K処理後のPrP^{Sc}とは反応しなかったがグアニジン変性では反応がみられたので、これらのエピトープはPrP^{Sc}凝集体分子上に抗体が結合できる形では存在していないことが判明した。また細胞膜上の成熟型に反応する抗体がある一方で細胞内の未熟型のみと反応するものがあつた。液化エチレンオキシド(LEO)処理および高温高圧処理によるプリオン不活化に伴うPrP^{Sc}分子の変化について解析した。0.7%LEO処理ではプリオン感染価は未処理の2%まで減少し、B103抗体により検出されるPrP^{Sc}は量的に感染性の減衰と同じ割合で減少した。一方、mAb31C6でPrP^{Sc}を検出した場合は、PrP^{Sc}の減少は未処理対照と比較して最大でも60%程度であつた。従つて、PrP^{Sc}分子の分解のみならず、特定のアミノ酸の修飾もプリオンの不活化に関与すると考えられた。一方、熱処理によるPrP^{Sc}分子の変化は検出に用いた抗体すべてで同様であつた。従つて、熱処理ではPrP^{Sc}分子の加水分解がプリオン不活化に関与すると考えられた。(堀内)。
- ⑨ プリオンの複製増殖に関与する補助因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞を用

いて RNA 干渉による遺伝子スクリーニングを行った。140 個の遺伝子の解析を終了し、異常型プリオン蛋白の発現を抑制する 7 個の遺伝子と、異常型プリオン蛋白の発現を亢進する 1 個の遺伝子を確認した。(堂浦)。

- ⑩ プリオン病の早期診断および感染・発症機構の解明を目的として、マイクロアレイによるプリオン感染マウスそしてプリオン発現培養細胞で発現遺伝子プロファイリングを行った。発現の変動した遺伝子を同定したが、マウスの実験との共通性や PrPSc の増幅機序と CR によるその阻害機序でも異なっていた(三好)。
- ⑪ Doppel 蛋白非産生の 1 型プリオン遺伝子欠損マウスから神経細胞株を樹立し、種々の動物プリオン遺伝子を導入し、培養細胞での感染実験が可能となった。マウスプリオン遺伝子導入細胞にスクレイピー株を感染させた結果、一過性増殖がみられた(小野寺)。
- ⑫ マウスから神経幹細胞を分離培養し、スクレイピープリオンと共培養したところ、プリオンの増幅を示唆する所見が得られた。またマウスプリオン遺伝子ノックアウトマウスから神経幹細胞を樹立し、外来性プリオン遺伝子を発現させた(高橋)。

3) 食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発

- ① と畜時の脳・脊髄組織による食肉等への汚染防止法の開発を目的とし、と畜時のスタンニング、ピッシング操作、背割り位置と神経組織汚染との関連について、枝肉、ブロック肉、市販食肉を用い、グリア繊維性酸性タンパク(GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein)をマーカーとして、全国 8 カ所の食肉衛生検査所で検討した。ピッシングやスタンニングによる血液への神経組織の混入についてはすべて検出限界以下であった。中枢神経系組織の細胞マーカーである GFAP の残留について、全国各地の 9 と畜場で処理された牛枝肉及びブロック肉、さらに一般に流通している市販牛肉を対象として ELISA 法で調査した。施設によっては、と畜場における洗浄後の牛枝肉、カット工場処理された牛ブロック肉から GFAP が検出され、脳・脊髄組織が残留しているものと思われた。市販牛肉は、不検出であった。脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するには、枝肉の背割りを正中線から左右どちらかにずらすことが最も効果的であった。これが不可能なときは、枝肉に水を流し

ながら背割りを行い、その後自動高圧洗浄装置により枝肉全体を洗浄、さらに手動の高圧洗浄機により脊髄周囲を重点的に洗浄することが必要と考えられた。(佐々木、沢谷)。

D. 考 察

1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発

BSE プリオンと反応する新規モノクローナル抗体を 2 種以上開発し、そのうち 1 種は繰り返し配列由来のエピトープを認識し、細胞内プリオン動態の一部を明らかにした。診断系への応用はこれから着手することになる。わが国の BSE 例から参照品を作製し、性状解析が終了した。現行の ELISA 法との感度比較が可能となり、国内 2 社のキットについて評価ができた。今後開発されるキットの評価に使用可能である。新規スクリーニング検査として期待される蛍光相関分光法の小型装置および自動化が完成し、データを取る準備ができたので、今後の実用化試験の結果が期待できる。確認検査で使われる病理・免疫組織化学法の改良が進み、実用化と迅速化が可能となった。また高感度化を目指した新規検出法も開発された。ウエスタンブロット法の検出感度が明らかとなり、実際の診断に応用され、BSE 例のプリオンの体内分布を明らかにした。特定危険部位を説明できる具体的データが得られた。また神奈川 BSE2 例目の検討で末梢神経からプリオンを検出した。国内 BSE 死亡牛の末梢神経からも微量検出されている。牛プリオン遺伝子組換えマウスが 4 系統作出され、性状解析がほぼ終了した。うち 1 系統は脾臓での蓄積を指標とした伝達性の確認には使用可能であるが、脳内蓄積は不十分で、研究資源として BSE プリオンの供給には至らなかった。プロモーターの変更が必要と考えられる。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明

わが国で摘発された BSE6 頭目までについて近交系マウスへの伝達性が明らかとなった。初代では約 400-500 日までに発症した。千葉例については継代を繰り返すことにより潜伏期間は短縮したが、継代後もほぼ性状は維持され、英国由来の BSE と類似していた。これらの株化が進めば今後の BSE 研究の資源となる。ほかの例については実験継続中である。米国から輸入した牛プリオン遺伝子改変マウスの脳内接種では 240 日で発症したので、このマウスを使った研究も今後開始できる。サルやウシへの感染実験が行われているが、いまだ発症しておらず経過観察中である。牛では来年度後半以降、サルでは 2 年後以降の発症が推測さ

れ、順調に観察データと検体の採取が進んでいる。研究資源の蓄積により、新たな解析方法が開発された際には重要なサンプルとなり、研究の広がりを促進できるであろう。また研究資源の管理・配布の原則、そして分担研究者への研究材料分与についてマニュアルと書式を作製した。わが国のホルスタイン、和牛そして BSE6 例（すべてホルスタイン）のプリオン遺伝子解析が終了し、変異や欠失が明らかとなった。BSE 例に特徴的な変異は認められなかった。この点は外国で報告されている結果と同じであった。また、基礎研究として、プリオン病の脳病変形成機序として脳内サイトカインの活性化の結果がえられた。マイクロアレイ解析はいまだ初期段階にあるが、この両者により病態の解明が進むことを今後期待したい。神経細胞株や神経幹細胞にプリオン遺伝子を導入し *in vitro* での解析の準備ができ、一部の結果がでた。将来の培養細胞でのプリオン検出や解析が期待できる。プリオンの不活化機序としてアミノ酸修飾と加水分解が考えられる結果が得られ、今後の立体構造解析や不活化法の開発研究に重要なデータが得られた。また RNA 干渉を用いた増殖に係わる補助因子の解析がすすみ、また副次的に新たな PrP 発現機構の存在が示唆され、今後の研究成果が期待される。

3) 食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発

と畜時における脊髄神経組織の食肉への汚染防止法の開発は SRM 除去とともに重要な問題である。今回の GFAP を指標とした脊髄の食肉への汚染評価方法の確立とその結果や問題点の把握により、新しい安全なと畜法の開発および普及につながっていくものと期待される。

E. 結 論

プリオンの高感度・迅速検査法の開発、海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明、そして食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発という本研究班の課題は概ね達成されたと考えられる。BSE 牛の摘発と解析についてほぼ世界レベルに達し、研究資源の蓄積とともに、わが国の BSE 研究のベースができた。

F. 健康危険情報

BSE 陽性牛の末梢神経組織にプリオンが検出できた。その量は脊髄の 1/1,000-1/3,000 と考えられた。BSE 牛の脳、脊髄、三叉神経節、背根神経節、回腸、脾臓、眼にはプリオンが計 99.74% 沈

着することが報告されているが、残りの 0.26% のうちの一部と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
省略（各分担研究報告書参照）。
2. 学会発表
省略（各分担研究報告書参照）。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
 - 1) 横田博, 堂浦克美: 体外診断キット及び体外診断方法。特願 2004-216510、2004 年 7 月 23 日
 - 2) 竹中繁織, 野島高彦, 大塚圭一, 堂浦克美: 異常プリオンの電気化学的検出方法。特願 2004-287562、2004 年 9 月 30 日
 - 3) 蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び/又は測定法、発明者: 金城 政孝、堀内 基広、藤井 文彦、坂田 啓司、田村 守、上野 雅由、柳谷 孝幸、出願人: 独立行政法人科学技術振興機構、富士レビオ株式会社、アメリカ、特願 2004-166440、2004 年 6 月 3 日。
 - 4) 水溶性蛍光材料およびその製造方法、発明者: 金城 政孝、田村 守、藤井文彦、坂田啓司、神隆、出願人: 独立行政法人科学技術振興機構、日本、特願 2004-275675、2004 年 9 月 22 日。

2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
<u>品川森一</u> 、 <u>堀内基広</u>	スクレイピー	品川森一、立石潤、山内一也	人と動物のプリオン病	近代出版	東京	2003	91-163
<u>堀内基広</u>	プリオンと輸血	池田久實	次世代の血液製剤を考える	エフ・コピント・富士書院	札幌	2003	101-109
<u>堂浦克美</u>	プリオン病研究の進歩	杉田秀夫、高橋清久	脳科学研究の現状と課題	じほう社	東京	2003	311-315
<u>高橋秀宗</u> 、 <u>佐多徹太郎</u>	クロイツフェルト・ヤコブ病	国立感染症研究所学友会	感染症の事典	朝倉書店	東京	2004	80-82
Prusiner SB, Williams E, Laplanche J-L, <u>Shinagawa M</u>	Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy.	SB Prusiner	Prion Biology and Diseases, Second Edition	Cold Spring Harbor Laboratory Press	New York	2004	545-594

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
1	<u>Horiuchi M</u> , Nemoto T, <u>Ishiguro N</u> , Muramatsu Y, <u>Furuoka H</u> , Matsui T, Mohri S, <u>Shinagawa M</u>	Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan.	J Clin Microbiol	40	3421-3426	2002
2	Takekida K, <u>Kikuchi Y</u> , Yamazaki T, <u>Horiuchi M</u> , Kakeya T, <u>Shinagawa M</u> , Takatori K, Tanimura A, Tanamoto K, Sawada J	Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting.	J Health Science	48	288-291	2002
3	<u>Kikuchi Y</u> , Kaneya T, Yamazaki T, Takekida K, Nakamura N, <u>Matsuda H</u> , Takatori K, Tanimura A, Tanamoto K, Sawada J.	G ¹ -dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G.	Biol Pharm Bull	25	728-733	2002
4	<u>Horiuchi M</u> , Nemoto T, <u>Ishiguro N</u> , <u>Furuoka H</u> , Mohri S, <u>Shinagawa M</u> .	Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan.	J Clin Microbiol	40	3421-3426	2002
5	Kitamoto T, Mohri S, Ironside JM, <u>Miyoshi I</u> , Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin RW	Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions.	Biochem Biophys Res Commun	294	280-286	2002
6	Gombojav A, <u>Ishiguro N</u> , <u>Horiuchi M</u> , Serjmayadag D, Byambaa B, <u>Shinagawa M</u> .	Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep.	J Vet Med Sci	65	75-81	2003

7	Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, <u>Horiuchi M</u> , Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S.	Cellular prion protein promotes Brucella Infection into macrophages.	J Exp Med	198	5-17	2003
8	Okamoto M, <u>Furuoka H</u> , <u>Horiuchi M</u> , Noguchi T, Hagiwara K, Muramatsu Y, Tomonaga K, Tsuji M, Ishihara C, Ikuta K, Taniyama H.	Experimental Transmission of Abnormal Prion Protein (PrP ^{sc}) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice.	Vet Pathol	40	723-727	2003
9	Oishi T, Hagiwara K, Kinumi T, <u>Yamakawa Y</u> , Nishijima M, Nakamura K, Arimoto H.	Effects of β -sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP(81-145)	Org Biomol Chem	1	2626-2629	2003
10	<u>Yamakawa Y</u> , Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M., Higuchi Y, Sato Y, <u>Sata T</u> , the Expert committee for BSE diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan	Atypical Proteinase K Resistant Prion Protein (PrP ^{res}) observed in an apparently healthy 23month Old Holstein Sterer.	Jpn J Infect Dis	56	221-222	2003
11	Nakamura N, Shimokawa M, Miyamoto K, Hojyo S, Horiuchi H, Furusawa F, <u>Matsuda H</u> .	Two expression vectors for the phage-displayed chicken monoclonal antibody.	J Immunol Methods	280	157-164	2003
12	Nakamura N, Miyamoto K, Shimokawa M, Nishida N., Mohri S, Kitamoto T, Horiuchi H, Furusawa S, <u>Matsuda H</u> .	Generation of antibodies against prion protein by scrapie-infected cell immunization of PrP0/0 mice	Hybridomas and Hybridomics	22	263-266	2003
13	<u>Kikuchi H</u> , Yamada T, Furuya H, <u>Doh-ura K</u> , Ohyagi Y, Iwaki T, Kira J.	Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis.	Acta Neuropathol (Berl)	105	462-468	2003
14	Nishida T, Tokumaru AM, <u>Doh-ura K</u> , Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K.	Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions	Intern Med	42	199-202	2003
15	Sasaki K, <u>Doh-ura K</u> , Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T.	Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease	Acta Neuropathol	106	92-96	2003
16	Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, <u>Doh-ura K</u> .	A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo	Lab Invest	83	1751-1759	2003

17	Gombojav A, Shimauchi I, <u>Horiuchi M</u> , <u>Ishiguro N</u> , <u>Shinagawa M</u> , Kitamoto T, Miyoshi I, Mohri S, Takata M.	Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep,bovine and human PrP gene to sheep scrapie.	J Vet Med Sci	65	341-347	2003
18	Okamoto M, <u>Furuoka H</u> , <u>Horiuchi M</u> , Noguchi T, Hagiwara K, Muramatsu Y, Tomonaga K, Tsuji M, Ishihara C, Ikuta K, Taniyama H.	Experimental transmission of abnormal prion protein (PrP ^{Sc}) in the small intestinal epithelial cells of neonatal mice.	Vet Pathol	40	723-727	2003
19	Gombojav A, Shimauchi I, <u>Horiuchi M</u> , <u>Ishiguro N</u> , <u>Shinagawa M</u> , Kitamoto T, <u>Miyoshi I</u> , Mohri S, Takata M	Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie.	J Vet Med Sci	65(3)	341-347	2003
20	Kim C-L, Umetani A, Matsui T, <u>Ishiguro N</u> , <u>Shinagawa M</u> , <u>Horiuchi M</u> .	Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies.	Virology	320	40-51	2004
21	Kim C-L, Karino A, <u>Ishiguro N</u> , <u>Shinagawa M</u> , <u>Horiuchi M</u> .	Cell surface retention of PrP ^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation.	J Gen Virol	85	3473-3482	2004
22	Gombojav A, <u>Ishiguro N</u> , <u>Horiuchi M</u> , <u>Shinagawa M</u> .	Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds.	J Vet Med Sci	66	1293-1295	2004
23	Hayashi H, Takata M, Iwamaru Y, Ushiki Y, Kimura KM, Tagawa Y, <u>Shinagawa M</u> , Yokoyama T.	Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein.	J Vet Med Sci	66	515-520	2004
24	Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, <u>Yamakawa Y</u> , Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K.	Non-glycosylphosphatidylinositol GPI-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP ^{Sc} replication in vitro.	Amyloid: J Protein Folding Disord	11	14 - 20	2004
25	Nakamura N, Shuyama A, Shimokawa M, Miyamoto K, Hojyo S, Horiuchi H, Furusawa S, <u>Matsuda H</u> .	Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein.	J Vet Med Sci	66	807-814	2004
26	Nishibori N, Shimamoto T, Horiuchi H, Furusawa S, <u>Matsuda H</u> .	Expression vectors for chicken-human chimeric antibodies.	Biologicals	32	213-218	2004
27	Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, <u>Doh-ura K</u> , Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M.	Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics.	J Neuroimaging	14	63-66	2004

28	Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, <u>Doh-ura K</u> , Kitamoto T, Itoyama Y.	Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation.	Neurology	62	502-505	2004
29	Murakami-Kubo I, <u>Doh-ura K</u> , Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T.	Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies.	J Virol	78	1281-1288	2004
30	Furukawa H, <u>Doh-ura K</u> , Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M.	A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins.	J Biol Chem	279	23661-23667	2004
31	Ishikawa K, <u>Doh-ura K</u> , Kudo Y, Nishida N, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T.	Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies.	J Gen Virol	85	1785-1790	2004
32	<u>Doh-ura K</u> , Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T.	Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models.	J Virol	78	4999-5006	2004
33	Furukawa H, <u>Doh-ura K</u> , Sasaki K, Iwaki T.	Accumulation of prion protein in muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: in vivo model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues.	Lab Invest	84	828-835	2004
34	Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, <u>Doh-ura K</u> , Mugikura S, Tamura H, Higano S, Takahashi S, Itoyama Y.	Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease.	Neurology	63	443-449	2004
35	<u>Kikuchi Y</u> , Kakeya T, Sakai A, Takatori K, Nakamura N, <u>Matsuda H</u> , Yamazaki T, Tanamoto K, Sawada J.	Propagation of a protease-resistance form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G.	J Gen Virol	85	3449-3457	2004
36	<u>Furuoka H</u> , Yabuzoe A, <u>Horiuchi M</u> , Tagawa Y, Yokoyama T, <u>Yamakawa Y</u> , <u>Shinagawa M</u> , <u>Sata T</u> .	Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals.	Acta Neuropathol		Published online Dec 22	2004
37	Sakudo A, Lee DC, Yoshimura E, Nagasaka S, Nitta K, Saeki K, Matsumoto Y, Lehmann S, Itohara S, Sakaguchi S, <u>Onodera T</u> .	Prion protein suppress perturbation of cellular copper homeostasis induced by oxidative stress.	Biochem Biophys Res Commun	313	850-855	2004
38	Nishimura T, Sakudo A, Nakamura I, Lee DC,	Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxidase	Biochem Biophys Res	323	218-222	2004

	Taniuchi Y, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T.	level and prevents copper-induced apoptosis.	Commun			
39	Hayashi HK, Yokoyama T, Takata M, Iwamaru Y, Imamura Y, Ushiki YK, Shinagawa M.	The N-terminal cleavage site of PrP ^{Sc} from BSE differs from that of PrP ^{Sc} from scrapie.	Biochem Biophys Res Commun	328	1024-1027	2005
40	Sasaki K, <u>Doh-Ura K</u> , Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T.	Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study.	Neuropathol Appl Neurobiol	31	80-87	2005
41	Sakudo A, Lee DC, Nishimura T, Li S, Tsuji S, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, <u>Onodera T</u> .	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
42	Sakudo A, Lee DC, Li S, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, <u>Onodera T</u> .	PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP deficient neuronal cell line.	Biochem Biophys Res Commun	328	14-19	2005

Biological and Biochemical Characterization of Sheep Scrapie in Japan

Motohiro Horiuchi,^{1,2*} Takuya Nemoto,¹ Naotaka Ishiguro,¹ Hidefumi Furuoka,³ Shirou Mohri,⁴ and Morikazu Shinagawa¹

Department of Veterinary Public Health,¹ Research Center for Protozoan Diseases,² and Department of Veterinary Pathology,³ Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, and Department of Laboratory of Animal Science, Center of Biomedical Research, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka,⁴ Japan

Received 22 January 2002/Returned for modification 21 April 2002/Accepted 18 June 2002

Due to the apparent absence of an agent-specific nucleic acid genome, scrapie strains cannot be classified by genome characterization, which is commonly used for the classification of many viruses. However, scrapie strains can be distinguished to some extent by biological properties such as transmissibility to experimental animals and distribution of neuropathological lesions and by biochemical properties such as the molecular mass and relative protease-resistance of the disease-specific isoform of prion protein (PrP^{Sc}). In order to preliminarily characterize the scrapie strains that are prevalent in Japan, we analyzed the transmissibility of sheep scrapie isolates to mice and the relative proteinase K (PK) resistance of the corresponding PrP^{Sc}. The results indicate that Japanese scrapie strains can be divided into at least three groups based on biological and biochemical properties. The first group includes isolates which cause disease in mice with an incubation period of ~400 days and possess PrP^{Sc} with relatively high PK resistance. Isolates of the second group contain PrP^{Sc} that is highly resistant to PK digestion but transmit poorly to mice. The final group consists of isolates that cause disease in mice with an incubation period of less than 300 days and are associated with PrP^{Sc} with reduced PK resistance. Sheep scrapie has occurred sporadically in Japan since 1982, with only ~60 officially reported cases so far. However, the diversity of scrapie strains in the field suggested by our data raises the concern that a scrapie strain similar to the parental agent of bovine spongiform encephalopathy could exist or emerge in Japan. Thus, continuous surveillance for scrapie will be required to prevent the further spread of scrapie, not only among the sheep population but also to other species, and to eliminate any potential risk of sheep scrapie to public health.

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are fatal neurodegenerative diseases, which include scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy (BSE), and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. Scrapie has existed for more than two centuries, while BSE was first recognized in 1985, followed by a BSE epidemic in the United Kingdom (31). Epidemiological studies suggested that BSE was primarily caused by feeding meat and bone meal (MBM) contaminated with scrapie agent to cattle (32). Once BSE appeared, the causative agent spread through the cattle population by the use of BSE agent-contaminated MBM. The appearance of feline spongiform encephalopathy (FSE) in domestic and captive cats (34, 35) and, more recently, variant CJD (vCJD) in humans in 1996 (33), has raised a global concern for the spread of the BSE agent to other species via the food chain.

It is known that there are biologically distinguishable sheep scrapie strains in the United Kingdom (8, 11); however, BSE isolates studied so far appear to have comparatively uniform characteristics (4). The biological and biochemical properties of the BSE agent are very similar to those of the agents of vCJD and FSE, providing strong evidence that cross-species transmission of BSE to humans and felids resulted in vCJD and FSE, respectively (7, 13). Thus, it is now probable that a

particular scrapie strain, which possessed enhanced resistance to heat inactivation, survived the rendering process and was transmitted to cattle via contaminated MBM. Thereafter, the agent passed into humans, possibly via the food chain. Alternatively, a particular strain capable of infecting both cattle and humans might have been selected and amplified during the transmission of the scrapie agent to cattle.

One of the characteristics of TSEs is an accumulation of a protease-resistant, abnormal isoform of a host protein, PrP^{Sc}, which is specifically detected in the central nervous system and lymphoid tissues of scrapie-affected animals. PrP^{Sc} is post-translationally generated from the host-encoded sialoglycoprotein, prion protein (PrP^C). PrP^C and PrP^{Sc} have the same primary structure (14) but different conformations as detected by analysis of biophysical properties (24, 27) and biochemical properties, such as resistance to protease digestion and solubility in nonionic detergent (23). The presence of PrP^{Sc} usually correlates with scrapie infectivity. Thus, PrP^{Sc} is thought to be one of the major components of the scrapie agent, and so detection of PrP^{Sc} is often considered an indication of the presence of infectivity. Although the exact nature of the scrapie agent is still controversial, the failure to find an agent-specific genome to date prevents the use of nucleic acid sequencing for strain characterization, a method commonly used for strain typing of viruses and bacteria (1, 22). However, TSE agents can be distinguished to some extent by incubation periods and distribution of neuropathological lesions on transmission to experimental animals (5, 6), as well as biochemical properties, such as relative protease resistance and/or molec-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan. Phone: 81-155-49-5392. Fax: 81-155-49-5394. E-mail: horiuchi@obihiro.ac.jp.

ular mass of PrP^{Sc} (2, 3, 25, 30) and differences in the ratio of glycosylated PrP^{Sc} bands (10).

There is a sporadic occurrence of scrapie in Japan, and the existence of BSE was disclosed in September 2001. Since BSE is thought to originate from sheep scrapie, surveillance of scrapie-positive sheep and characterization of prevalent scrapie strains in the field are required for the prediction and elimination of a potential risk of scrapie to public health. In order to attempt to characterize scrapie strains present in Japan, we analyzed several isolates for their transmissibility to mice and the biochemical properties of the associated PrP^{Sc}. The results showed that at least three different strains of scrapie agent exist in Japan.

MATERIALS AND METHODS

Sheep with scrapie. Eight naturally occurring sheep scrapie isolates (KH2, KU, SB, Y2, Y5, S1, S2, and S3) collected from 1987 to 1996 and three first-passage isolates from experimental sheep scrapie infections (A1, B3, and G1) were used in this study. As a negative control, one sheep (S4), which was defined as negative for scrapie by the absence of both neuronal vacuolation in histopathological examination and detectable PrP^{Sc} in central nervous system and lymphoid tissues in immunoblot analysis, was also used. Sheep S1, S2, S3, and S4 were kept on ranch S. Sheep S1, S2, and S3 had been born from two ewes which showed neurological dysfunction several months after delivery and were diagnosed with scrapie by clinical and/or histopathological methods. The sheep S1, S2, and S3 shared the same sire. However, there were no disease-associated mutations in the PrP genes of these sheep, and thus the sheep S1, S2, and S3 were tentatively grouped as cases of endemic scrapie. Sheep KH2, KU, and SB, each from independent ranches, and sheep Y2 and Y5 from ranch Y, were grouped as sporadic cases because there is no immediate blood relationship among these sheep. Sheep A1 and B3 with experimental scrapie received the same brain homogenate of a scrapie-affected sheep that was not included in the natural scrapie group used here, and the results of experimental transmission of this sheep scrapie isolate to mice were reported elsewhere (29). Sheep G1 was inoculated intravenously with a 10% brain homogenate of scrapie-affected sheep Y4 from the Y ranch. Sheep Y2, Y4, and Y5 were grown on the same farm and developed scrapie within 6 months, but they were born to different ewes.

PrP genotyping of sheep. PrP genotyping of sheep was performed as described previously (18). Amino acid polymorphisms at codons 112 Met/Thr, 136 Ala/Val, 154 Arg/His, and 171 Gln/Arg/His were basically used for distinction of the PrP genotype.

Bioassay. Twenty microliters of 10% brain homogenates (in phosphate-buffered saline) from scrapie-affected or scrapie-negative sheep were inoculated intracerebrally into 4-week-old female ICR mice (PrP allotype PrP^{A/A}; PrP^A encodes PrP with codons 108 Leu and 189 Thr). In some cases I/LnJ mice (PrP allotype PrP^{B/B}; PrP^B encodes PrP with codons 108 Phe and 189 Val) were also used. When mice showed clinical symptoms of the terminal stage of scrapie, mice were sacrificed under anesthesia and brains were removed and processed for the detection of PrP^{Sc}. The brains of mice that died of unknown causes were also checked for the presence of PrP^{Sc}.

Sample preparation and PK digestion. Preparation of brain samples for proteinase K (PK) digestion was carried out as described elsewhere with slight modifications (12). Brains were homogenized with 7 volumes (wt/vol) of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 7.5 mM MgCl₂, and the homogenates were incubated at 37°C for 1 h with DNase I (40 µg/100 mg tissue). After adding 20% Sarkosyl to a final concentration of 5%, the homogenates were kept at room temperature (RT) for 30 min and then centrifuged at 12,000 × g at RT for 5 min. The resulting supernatants were transferred to new tubes, and then solid NaCl was added to give a final concentration of 10%. After a 16-h incubation at 4°C with continuous rotation, the homogenates were centrifuged at 16,000 × g, 4°C and, for 40 min, and the resulting pellet was resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). This suspension was subjected to PK digestion at various PK concentrations and times as indicated in each experiment. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) was added to stop the digestion (final conc. 1 mM), and then the reaction mixture was adjusted to 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) and boiled for 5 min. The proteins were precipitated with 10 volumes of ice-cold methanol, and the final pellet was dissolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in sample buffer (4% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 5% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]).

Detection of PrP^{Sc}. (i) **Immunoblot analysis.** Immunoblot analysis was carried out as described previously with B-103 rabbit serum (16). Densitometric analysis of X-ray film was performed with a Lane & Spot Analyzer (Atto, Tokyo, Japan).

(ii) **Dot blot analysis.** The 10% brain homogenates of sheep with scrapie were mixed with an equal volume of cold lysis buffer [0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)], diluted serially in twofold steps and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was dried and then washed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST). The membrane was treated with PK (25 µg/ml) in TBST at 37°C for 1 h, and the reaction was stopped by adding PMSF to a final concentration of 2 mM. After washing with TBST, the membrane was treated with 3 M guanidinium isothiocyanate for 20 min at RT and washed with TBST again. Immunostaining of the membrane was then performed as described for the immunoblot analysis.

RESULTS

Sheep with scrapie. Characteristics of the sheep used in this study are summarized in Table 1. The major symptoms of all scrapie cases used here were ataxia and, at the terminal stage, astasia. No sheep except for KU showed obvious loss of fleece, which is thought to be caused by pruritus. The sheep S1, S2, and S3, which were tentatively grouped as cases of endemic scrapie (see Materials and Methods), differed from other sheep with scrapie. They showed hypersensitivity at the onset of disease and died of scrapie at a considerably young age (average, 16.3 months old) compared to sheep with scrapie grouped as sporadic cases here (average, 42.0 months old) or those described by others (2 to 6 years old [11]).

Transmissibility of sheep scrapie to mice. Transmission of 11 sheep scrapie samples to mice is shown in Table 2. Eight of 11 successfully transmitted to ICR mice (PrP allotype, PrP^{A/A}), with average incubation periods from 229 to 451 days postinfection (dpi). These eight sheep scrapie samples seem to be divided into two groups based on the incubation periods; one includes A1 and B3, which transmitted to mice with incubation periods of around 230 dpi, and the other includes KH2, KU, SB, Y2, Y5, and G1, which caused disease in mice with incubation periods of ~386 to 451 dpi. There is no significant difference among the incubation periods of KH2-, KU-, SB-, Y2-, and Y5-inoculated mice ($P > 0.05$ in t test). However, the incubation period of G1-inoculated mice was somewhat shorter than that of the others, with a statistically significant difference between the incubation period of G1-inoculated mice and that of KH2-, SB-, and Y2-inoculated mice ($P < 0.05$ in t test). The sheep A1 and B3 received the same brain homogenate from a naturally occurring sheep scrapie isolate by intravenous injection. The transmission of this parental isolate of A1 and B3 directly to mice was achieved within 271 to 307 dpi (29), consistent with the incubation periods observed in A1- and B3-inoculated mice. Thus, the first-pass scrapie samples A1 and B3 and their parental isolate all possessed the ability to transmit to mice with relatively short incubation periods.

In contrast, the S1, S2, and S3 scrapie isolates were virtually nontransmissible to ICR mice (Table 2). One mouse inoculated with the brain homogenate of sheep S1 died at 359 dpi without typical symptoms of scrapie but was positive for PrP^{Sc} in the brain. We cannot confirm whether this one case is due to actual transmission or contamination with a mouse-adapted scrapie agent. Several ICR mice inoculated with the brain homogenates of S2 or S3 sheep died without typical symptoms

TABLE 1. Sheep used in this study

Sheep	Breed ^a (age [mo]) ^b	PrP genotype ^c	Symptom(s)
With scrapie			
Sporadic			
KH2	S (48)	MARQ/MARR	NA ^d
KU	S (52)	MARQ/TARQ	Ataxia, subtle loss of fleece
SB	S (34)	MARQ/MARQ	Ataxia, debilitation
Y2	S (35)	MARQ/MARQ	Ataxia, debilitation
Y5	S (41)	MARQ/MARQ	Ataxia, debilitation
Endemic			
S1	S × C (12)	MARQ/MARH	Ataxia, hypersensitivity
S2	S × C (21)	MARQ/MARH	Ataxia, hypersensitivity
S3	S × C (16)	MARQ/MVRQ	Ataxia, hypersensitivity
Exptl			
A1	S (27)	MARQ/MARQ	Ataxia
B3	S (21)	MARQ/TARQ	Ataxia
G1	S (26)	MARQ/MARQ	Ataxia, debilitation
Healthy (S4)	S × C (20)	MARQ/MARQ	

^a Abbreviations: S, Suffolk; C, Corriedale; S × C, F₁ of Suffolk and Corriedale.
^b Age of the sheep with scrapie grouped as sporadic or endemic indicates the age at death (months old), while that of the experimental group indicates time to death after inoculation (months postinoculation).
^c The nomenclature of PrP genotypes was described elsewhere (18).
^d NA, no record of clinical symptoms was available.

of scrapie during the observation period but were also negative for PrP^{Sc}. Therefore, it is obvious that S1, S2, and S3 differ from the other scrapie isolates used here. Furthermore, isolate S3 did not transmit to I/LnJ mice (PrP allotype, PrP^{B/B}), whereas transmission of isolate KH2 to these mice was confirmed by the detection of PrP^{Sc} at 275 dpi. The sheep S1, S2, and S3 were born on the same farm and in the same parturient season from two ewes that developed scrapie several months after delivery, and thus the sheep were potentially infected with the same agent. One explanation for the failure of the transmission of these isolates to mice is that the brain homogenates may possess a relatively low degree of infectivity. However, dot blot analysis of serial dilutions of brain homogenates revealed that variations in the amount of PrP^{Sc} in the homogenates appear to be less than fourfold among the samples tested (Fig. 1), suggesting that the lack of transmission was not due to reduced degrees of infectivity. Therefore, we conclude that the sheep scrapie isolates S1, S2, and S3 have an extremely low, if any, transmissibility to mice.

PK resistance of sheep PrP^{Sc}. Since some TSE strains are known to differ in the relative PK resistance of PrP^{Sc} (3), we analyzed the PK resistance of PrP^{Sc} in the brains of sheep with scrapie in order to identify any biochemical differences among sheep scrapie isolates. Partially purified PrP^{Sc}-containing fractions without PK treatment were first analyzed by immunoblot, and following densitometric analysis to allow normalization of the amount of PrP^{Sc} among the samples, the fractions were digested with PK at 0, 8, 40, 200, and 1,000 µg/ml for 2 h (Fig. 2a). The bands of PrP^{Sc} were clearly detected after PK treatment at 40 µg/ml in KH2 and S2, while PrP^{Sc} in A1 was undetectable under the same digest conditions. To confirm this difference, the same fractions were treated with PK at 40 µg/ml for various time periods (Fig. 2b). Consistent with the result in

TABLE 2. Transmissibility of sheep scrapie to mice

Sheep	Mouse strain	Dead mice (n/N) ^a	PrP ^{Sc} -positive mice (n'/N') ^b	Mean time to death ± SD (day)
Scrapie				
Sporadic				
KH2	ICR	6/6	5/5	417 ± 29
KH2	I/LnJ	5/5	3/3	274, 275, 275, 275, 307 ^d
KU	ICR	7/7	7/7	394 ± 672
SB	ICR	9/9	6/7	231, 451 ± 39 ^e
Y2	ICR	5/5	4/4	418 ± 42
Y5	ICR	5/5	5/5	427 ± 15
Endemic				
S1	ICR	1/6	1/6	359, >462 ^f
S2	ICR	5/6	0/6	301, 400, 430, 478, 536, >620
S3	ICR	2/7	0/7	222, 413, >620
S3	I/LnJ	5/5	0/5	188, 200, 270, 363, 603 ^g
Exptl				
A1	ICR	6/6	6/6	229 ± 12
B3	ICR	7/7	7/7	236 ± 14
G1	ICR	9/9	8/9	190, 386 ± 20 ^h
Healthy (S4)	ICR	0/4	ND ^c	>620

^a Abbreviations: n, number of animals which died of any cause during the observation period; N, number of animals which received brain homogenates.

^b Abbreviations: n', number of PrP^{Sc}-positive mice; N', number of mice used for the examination of PrP^{Sc}.

^c ND, not determined.

^d All the mice died of wounds received in violent fights without any symptoms of scrapie. The three mice which died at 275 dpi were found to be positive for PrP^{Sc}.

^e One mouse which died at 231 dpi was negative for PrP^{Sc}. The mean and SD for time to death were calculated from data for the remaining eight mice.

^f One mouse which died at 359 dpi did not show scrapie symptoms but was found to be positive for PrP^{Sc}.

^g Four mice died at 188, 200, 270, and 363 dpi due to fights.

^h One mouse which died at 190 dpi was negative for PrP^{Sc}. The mean and SD for time to death was calculated from data for the remaining eight mice.

Fig. 2a, the PrP^{Sc} bands in the A1 fraction were virtually eliminated by a 2-h treatment with 40-µg/ml of PK, while the PrP^{Sc} bands in the KH2 and S2 fractions were readily detected after the same treatment. The PrP^{Sc} of B3 exhibited the same PK resistance as A1, while KU, SB, Y2, Y5, S1, and S3 showed levels of PK resistance similar to KH2 and S2 (data not shown). Thus, the sheep scrapie isolates used here appeared to be

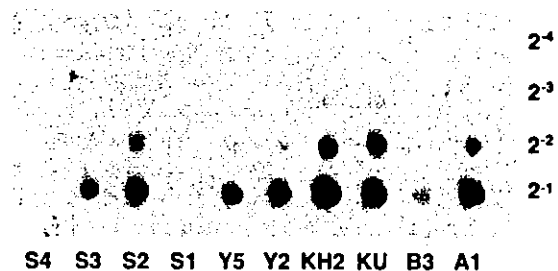


FIG. 1. Dot blot analysis of sheep brain homogenates for the presence of PrP^{Sc}. Serial twofold dilutions of sheep brain homogenates used for inoculation into mice were dotted onto a nitrocellulose membrane and stained with B-103 anti-PrP synthetic peptide rabbit serum and ECL Western blot detection reagent (Amersham). The sheep are indicated at the bottom and dilutions are on the right. In this dot blot analysis, S1 appears to be negative for PrP^{Sc}; however, PrP^{Sc} was detected in the immunoblot analysis (data not shown).

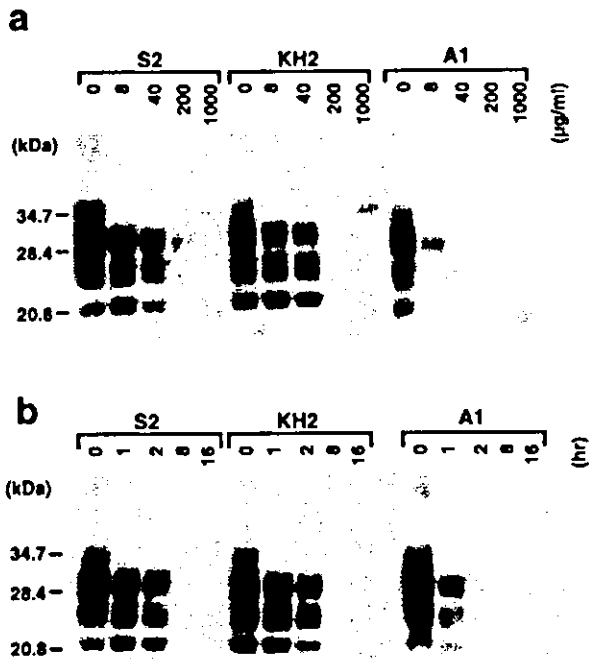


FIG. 2. Relative PK resistance of sheep PrP^{Sc}. (a) PrP^{Sc}-containing fractions prepared from sheep brains were treated with various concentrations of PK (0 to 1,000 µg/ml, indicated above the photo) at 37°C for 2 h. Molecular mass markers are indicated. PrP was detected by immunoblotting with PrP-specific antibody and ECL. (b) The same PrP^{Sc}-containing fractions as used in panel a were treated with PK (200 µg/ml) at 37°C for various times (0 to 16 h, indicated above the photo).

divided into two groups based on the relative PK resistance of PrP^{Sc}. One possesses PrP^{Sc} that is highly resistant to PK digestion, as defined by resistance to treatment with PK at 40 µg/ml for 2 h, and the other possesses PrP^{Sc} of relatively low PK resistance and is completely degraded under these conditions. Together, the mouse transmission and PrP^{Sc} PK resistance data can be used to further divide the sheep scrapie isolates into three groups (Table 3). The first group includes KH2, KU, SB, Y2, Y5, and G1, which are transmissible to ICR mice with incubation periods of ~400 days and contain PrP^{Sc} with relatively high PK resistance. The second group includes S1, S2, and S3, which transmit poorly to mice but possess PrP^{Sc} with a relative PK resistance similar to the first group. The last group includes A1, B3, and probably their parental isolate, which are transmissible to ICR mice with incubation periods of ~230 days and possess PrP^{Sc} with relatively low PK resistance.

PK resistance of PrP^{Sc} in mice inoculated with sheep scrapie. Sheep scrapie isolates which transmitted to ICR mice segregated into two groups based on incubation periods (Table 2), and interestingly, the grouping of sheep scrapie isolates by relative PK resistance of PrP^{Sc} in sheep brains appears to coincide with the grouping by incubation periods (Table 3). To address the question of whether the phenotype of relative PK resistance of PrP^{Sc} in sheep brain is conserved in infected mice, the relative PK resistance of PrP^{Sc} in the mouse brains was also examined (Fig. 3). PrP^{Sc} in the brain of a mouse inoculated with KH2 was resistant to treatment with PK at 200 µg/ml for 1 h, while PrP^{Sc} in the brain of a mouse inoculated with A1 was

TABLE 3. Grouping of sheep scrapie samples based on transmissibility to mice and relative PK resistance of PrP^{Sc}

Sheep	PK resistance ^a (Sheep PrP ^{Sc})	Transmissibility to ICR mice (mean ± SD [day])	PK resistance ^b (Mouse PrP ^{Sc})
Group 1			
KH2	H	Yes (417 ± 29)	H
KU	H	Yes (394 ± 67)	H
SB	H	Yes (451 ± 39)	ND ^c
Y2	H	Yes (418 ± 42)	ND
Y5	H	Yes (427 ± 15)	H
G1	H	Yes (386 ± 20)	ND
Group 2			
S1	H	No	NA ^d
S2	H	No	NA
S3	H	No	NA
Group 3			
A1	L	Yes (229 ± 12)	L
B3	L	Yes (236 ± 14)	L

^a H indicates PrP^{Sc} that is resistant to a treatment with PK (40 µg/ml) for 2 h, while L indicates PrP^{Sc} that is sensitive to the same treatment.

^b H indicates PrP^{Sc} that is resistant to a treatment with PK (200 µg/ml) for 1 h, while L indicates PrP^{Sc} that is sensitive to the same treatment.

^c ND, not determined.

^d NA, not available.

sensitive to this condition (Fig. 3a). This difference in the relative PK resistance was also confirmed by the experiments in Fig. 3b, in which the samples were treated with PK at 200 µg/ml for the various time periods indicated. PrP^{Sc} in the brains of mice inoculated with KH2 and Y5 showed the same PK resistance as that of a KH2-inoculated mouse, whereas PrP^{Sc} in the brain of a mouse inoculated with B3 showed the same PK resistance as that of an A1-inoculated mouse (data not shown). Therefore, the relative PK resistance of PrP^{Sc} generated in the brains of mice was similar to that of PrP^{Sc} in the inoculum of the corresponding sheep.

DISCUSSION

We were interested in characterizing the scrapie strains prevalent in Japan. In the absence of known biological clones (which would take many years to develop), we attempted to gain information about the nature of these strains by examining the biological and biochemical properties of a panel of isolates and showed that at least three types of scrapie strains exist in Japan. It is thought that the scrapie agent entered into Japan along with imported sheep in the 1970s (17, 29). Since the recognition of the first scrapie case early in the 1980s, ~60 scrapie cases have been officially reported so far. Thus, our data indicate the possibility that the primary scrapie strain has already exhibited considerable variation during the past quarter century. However, it is unknown if the current repertoire of scrapie strains is derived from a single parental strain that has been changing during its spread through the sheep population, similar to the mutation-like change found on serial transmission of the scrapie agent in experimental animals (20). Alternatively, multiple infection is likely to occur in natural scrapie (19), so that it is also possible that multiple strains have entered into Japan with imported sheep. The diversity of sheep scrapie strains in Japan seems similar to that described in the