

However, there have been no recent introductions of new populations of goats to the Hachijo Islands (data not shown).

The structure of the caprine PrP gene is highly homologous to that of the sheep PrP gene, including exons, the promoter region and 256 amino acids [5]. In the ORF of the PrP gene, amino acid polymorphisms associated with incubation period differ between sheep and goats. Polymorphisms at codons 142 and 143 in goats are thought to influence the incubation period of scrapie in experimental challenges [5] and natural cases [2]. Few of the goats in the present study carried polymorphisms at codons 142M or 143R (Table 2), which are associated with the resistance to scrapie. Identification of caprine PrP genotype may provide information that can be used to select scrapie-resistant goat for breeding. No scrapie has been found in goats in Japan, and PrP^{Sc} has not been found in Japan by TSE surveillance using Western blot analysis (unpublished data). Although the number of goats examined in the present study was relatively small, the present results provide useful data about variations and distribution of the caprine PrP gene, which can be used to assess the risk of scrapie in Japan.

REFERENCES

1. Belt, P. B. G. M., Muilerman, I. H., Schreuder, B. E. C., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L. J. and Smits, M. A. 1995. *J. Gen. Virol.* 76: 509-517.
2. Billins, C., Panagiotidis, C. H., Psychas, V., Argyroudis, S., Nicolaou, A., Leontides, S., Papadopoulos, O. and Sklaviadis, T. 2002. *J. Gen. Virol.* 83: 713-721.
3. Foster, J., Goldmann, W., Parnham, D., Chong, A. and Hunter, N. 2001. *J. Gen. Virol.* 82: 267-273.
4. Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. and Hope, J. 1994. *J. Gen. Virol.* 75: 989-995.
5. Goldmann, W., Martin, T., Foster, J., Hughes, S., Smith, G., Hughes, K., Dawson, M. and Hunter, N. 1996. *J. Gen. Virol.* 77: 2885-2891.
6. Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Hope, J. and Hunter, N. 1998. *J. Gen. Virol.* 79: 3173-3176.
7. Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmyadag, D., Byambaa, B. and Shinagawa, M. 2003. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 75-81.
8. Hunter, N., Foster, J. D., Dickinson, A. G. and Hope, J. 1989. *Vet. Rec.* 124: 364-366.
9. Hunter, N., Moore, L., Hosie, B. D., Dingwall, W. S. and Greig, A. 1997. *Vet. Rec.* 140: 59-63.
10. Ikeda, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Muramatsu, Y., Kai-Uwe, G. D. and Shinagawa, M. 1995. *J. Gen. Virol.* 76: 2577-2581.
11. Obermaier, G., Kretzschmar, H. A., Hafner, A., Heubeck, D. and Dahme, E. 1995. *J. Comp. Pathol.* 113: 357-372.
12. Prusiner, S. B. 1991. *Science.* 252: 1515-1522.
13. Shinagawa, M., Matsuda, A., Sato, G., Takeuchi, M., Ichijo, S. and Ono, T. 1984. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46: 913-916.
14. Wood, J. N. L., Done, S. H., Pritchard, G. C. and Wooldridge, M. J. A. 1992. *Vet. Rec.* 131: 66-68.

Surveillance of Chronic Wasting Disease in Sika Deer, *Cervus nippon*, from Tokachi District in Hokkaido

Natsumi KATAOKA¹⁾, Masakazu NISHIMURA²⁾, Motohiro HORIUCHI³⁾ and Naotaka ISHIGURO^{4)*}

¹⁾Laboratories of Veterinary Public Health, and ²⁾Pharmacology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, ³⁾Laboratory of Prion Disease, Graduate School of Veterinary Medicine Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0813, ⁴⁾Laboratory of Food and Environmental Hygiene Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan

(Received 3 September 2004/Accepted 24 November 2004)

ABSTRACT. Surveillance of chronic wasting disease (CWD) was conducted by performing Western blot analysis of tissue samples from 136 sika deer (*Cervus nippon*) killed by hunters in the Tokachi district of Hokkaido Island. No prion protein (PrP^{Sc}) associated with CWD was detected in any of the samples. To assess amino acid polymorphisms of the sika deer PrP gene, nucleotide sequencing of the PrP gene was performed. The only amino acid polymorphisms detected were 3 silent mutations at nucleotide positions 63, 225 and 408. These results suggest that sika deer in the Tokachi district are genetically homogeneous, and are not infected with CWD.

KEY WORDS: CWD, sika deer, surveillance.

J. Vet. Med. Sci. 67(3): 349-351, 2005

Chronic wasting disease (CWD) is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of captive and free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), mule deer (*O. hemionus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus*) in several US states and Canadian provinces [13, 15, 16]. This disease is characterized by progressive loss of body weight and abnormal behavior, and by the accumulation of a partially protease-resistant isoform (PrP^{Sc}) of a normal cellular protein (PrP^C) in the central nervous system. Thus, CWD is similar to scrapie in sheep and goats, and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle [1, 11]. Occurrence of CWD is currently limited to North American cervid ruminants.

Cervus nippon yezoensis, a subspecies of the sika deer (*Cervus nippon*) that inhabit the Japanese Islands, is native to Hokkaido Island of Japan. In recent decades, the number of sika deer in Hokkaido has increased rapidly due to protection by the Hokkaido government [6]. Overpopulation of sika deer has caused immense damage to agriculture and forestry in Hokkaido.

The meat of sika deer is frequently consumed as game meat or commercially processed as ham or sausage, especially in the Tokachi district of Hokkaido Island. Although there is no evidence that CWD can be transmitted to humans, the experience of transmission of other TSEs to humans via consumption of meat or other products from ruminants raises public health concerns about the safety of sika deer meat [10, 11]. However, little is known about occurrence of CWD among sika deer on Hokkaido Island. In the present study, we used Western blot analysis to examine occurrence of CWD among sika deer killed by hunters in the Tokachi district, and determined their PrP genotypes.

We used tissue samples from 136 sika deer (82 males and

54 females) killed by hunters over a 2-year period (51 deer in 2002, and 85 deer in 2003) at 13 sites in the Tokachi district (Fig. 1). The age of the deer ranged from approximately 1 to 7 years. Samples of the obex of the medulla

Hokkaido Island

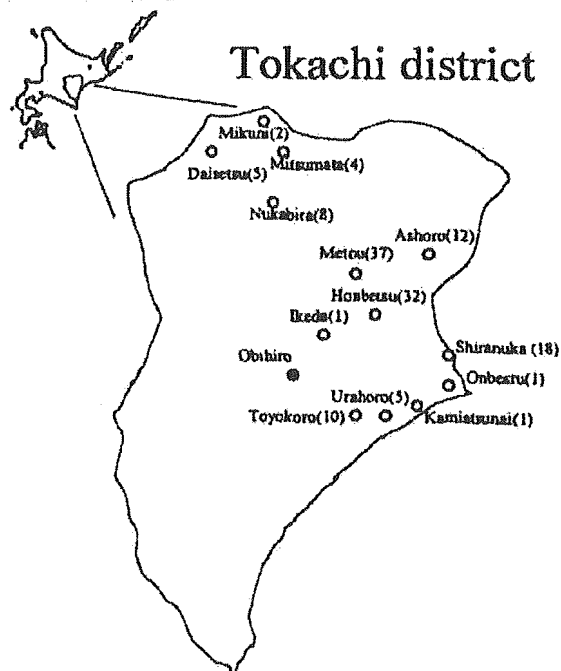


Fig. 1. Sampling sites of sika deer in Hokkaido. Tokachi district is enlarged. Numbers in parentheses are the number of sika deer killed by the hunters at each site. Obihiro city, which is indicated by a closed circle, is located at center of the Tokachi district.

* CORRESPONDENCE TO: ISHIGURO, N., Laboratory of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan.

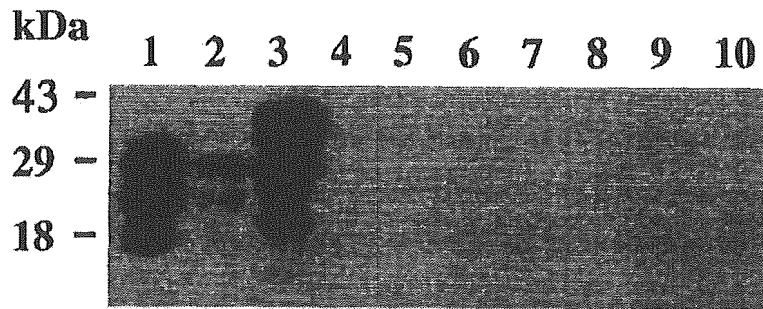


Fig. 2. Detection of PrP^{Sc} or PrP^C in sika deer tissue by Western blotting analysis. PrP^C and/or PrP^{Sc} from deer obex was prepared and dissolved in sample buffer as described previously [3]. The protein was resolved by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels and transferred to Hybond-PVDF membranes. PrP^{Sc} and/or PrP^C was detected with immunoblot analysis using mAb 44B1, and was visualized using the ECL system [3]. Lane 1, PK-digested mouse PrP^{Sc} fraction of 12- μ g tissue equivalent; lane 2, PK-digested mouse PrP^{Sc} fraction of 2- μ g tissue equivalent; lane 3, PK-undigested PrP^C fraction of 2-mg tissue equivalent; lanes 4 to 10, PK-digested obex extract of 10-mg tissue equivalent. Molecular mass markers (kDa) are shown on the left.

oblongata were tested for the presence of PrP^{Sc} using Western blot analysis, and buccal muscles were tested for polymorphisms of the PrP gene by DNA sequencing. The preparation of PrP^C and/or PrP^{Sc} from the deer obex was performed as described elsewhere, with and without proteinase K (PK), respectively [3]. The Western blot analysis was performed as described previously, using several anti-PrP mAbs [7], and blots were developed with ECL (Amersham Buckinghamshire, England) and detected with X ray film. PrP^{Sc} from the mouse-adapted Obihiro strain of scrapie was used as a positive control in Western blot analysis [3]. DNA was extracted from deer buccal muscle using a Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). The deer PrP gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 2 primers: BPrP3, GCAGATATAAGTCATCATGGTG; BPrP4, GGAAGGACAAAAGTGGTAGAAG [2]. The PCR products were purified using a QIAquick Kit (Qiagen), and DNA sequencing was performed as described previously [2].

To estimate the reactivity of anti-PrP mAbs to deer PrP^C or PrP^{Sc} molecules, the reactivity of 3 representative mAbs (132, 31C6 and 44B1, [7]) to deer PrP^C was examined by Western blot analysis. The mAbs 132 (which recognizes a linear epitope consisting of the amino acid sequence AVVGGLGGY) and 44B1 (which recognizes a discontinuous epitope consisting of mouse amino acid residues 155 to 231) reacted with the deer PrP^C, but the mAb 31C6 did not react with the deer PrP^C [7]. The lack of reactivity of the mAb 31C6 appears to be due to a difference in amino acid sequence between mouse and deer in the epitope region, as indicated by the DNA sequence of the deer PrP gene. Assays for deer PrP^{Sc} were performed by Western blot analysis using the mAbs 132 and 44B1. No PrP^{Sc}-specific molecules were detected in PK-treated obex extracts, although deer PrP^C and PrP^{Sc} from mouse-adapted scrapie (control) were observed in blots (Fig. 2).

Studies indicate that specific PrP alleles are associated with CWD in cervids [4,9]. Therefore, we examined the DNA sequences of the PrP gene in the present samples, to determine their PrP genotypes. With the exception of 3 silent mutations at nucleotide positions 63 (G→T) 255 (G→A) and 408 (C→T), the PrP sequences of the present samples were identical to the sequence with accession number AF009181 (from *Odocoileus hemionus*), and all possessed five octapeptide repeats. Specific PrP alleles were reported to be associated with CWD-positive white-tailed deer (Q⁹⁵ G⁹⁶ S¹³⁸) [4] and Rocky Mountain elk (M¹³²) [9]. These amino acid sequences are observed in the wild type of sika deer PrP gene, but, it is not known if the PrP polymorphisms are associated with the occurrence of CWD in cervids on the other continents except North America [11]. No polymorphisms were observed among the present samples at the DNA level, suggesting that sika deer in Hokkaido comprise a genetically homogenous population. These results are consistent with the findings of previous mitochondrial DNA analysis [8].

There were no indications of occurrence of CWD in the present tissue samples. The number and geographical distribution of tissue samples in the present study were extremely limited. Tonsillar biopsy examined with immunohistochemical staining is a useful technique for the preclinical diagnosis of CWD in mule deer and white-tailed deer [14]. This technique might be evaluated as a practical management tool in farmed live sika deer. CWD surveillance of sika deer in the Tokachi district is important, because deer meat and other deer products are frequently consumed by humans in that area, and because sheep scrapie has been detected on farms in the Tokachi district [5, 12]. Although there is no evidence that CWD has crossed the species barrier from deer to sheep, cattle or humans [10, 11], particular care is necessary when ensuring the safety of food products

from ruminants that can carry a TSE.

ACKNOWLEDGMENTS. We wish to thank the Tokachi Hunting Club for supplying deer tissue samples. This study was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (The 21st Century Center-of-Excellence Program; E-1) from the Ministry of Education, culture, Sports, Science and Technology of Japan.

REFERENCES

1. Bolton, D.C., Mckinley, M.P. and Prusiner, S.B. 1982. *Science* 218: 1309-1311.
2. Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmyadag, D., Byambaa, B. and Shinagawa, M. 2003. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 75-81.
3. Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Miyoshi, I., Mohri, S. and Takata, M. 2003. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 341-347.
4. Johnson, C., Johnson, J., Clayton, M., McKenzie, D. and Aiken, J. 2003. *J. Wildl. Dis.* 39: 576-581.
5. Ikeda, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Muramatsu, Y., Kai-Uwe, G.D. and Shinagawa, M. 1995. *J. Gen. Virol.* 76: 2577-2581.
6. Kaji, K. 1995. *Honyurui Kagaku (Mammalian Science)* 35: 35-43 (in Japanese).
7. Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M. and Horiuchi, M. 2004. *Virology* 320: 41-52.
8. Nabata, D., Masuda, R. and Takahashi, O. 2004. *Zool. Sci.* 21: 473-481.
9. O'Rourke, K.I., Besser, T.E., Miller, M.W., Cline, T.F., Spraker, T.R., Jenny, A.L., Wild, M. A., Zebarth, G.L. and Williams, E.S. 1999. *J. Gen. Virol.* 80: 2765-2769.
10. Raymond, G.J., Bossers, A., Raymond, L.D., O'Rourke, K.I., McHollaud, L.F., Bryant III, P.K., Miller, M.W., Williams, E.S., Smits, M. and Caughey, B. 2000. *EMBO J.* 19: 4425-4430.
11. Salman, M.D. 2003. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 761-768.
12. Shinagawa, M., Matsuda, A., Sato, G., Takeuchi, M., Ichijo, S. and Ono, T. 1984. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46: 913-916.
13. Spraker, T.R., Miller, M.W., Williams, E.S., Getzy, D.M., Adriaux, W.J., Schoonveld, G.G., Sponwart, R.A., O'Rourke, K.I., Miller, J.M. and Merz, P.A. 1997. *J. Wildl. Dis.* 33: 1-6.
14. Wild, A.M., Spraker, R. T., Sigurdson, J. C., O'Rourke, I. K. and Miller, W. M. 2002. *J. Gen. Virol.* 83: 2629-2634.
15. Williams, E.S. and Young, S. 1980. *J. Wildl. Dis.* 16: 89-98.
16. Williams, E.S. and Young, S. 1982. *J. Wildl. Dis.* 18: 465-471.

2. BSE 診断法の開発と現状

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

伝達性海綿状脳症（プリオン病）の病原体“プリオン”は 病原体特異的な核酸を持たず、主要構成要素は異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）である。病原体のゲノムに相当する核酸を持たないので、PCRによる病原体遺伝子の増幅はプリオン検出に応用できない。PrP^{Sc}は宿主遺伝子 PrP の産物であるためプリオンに対する免疫応答は起こらない 従って、血清診断も応用できない。現状では 中枢神経系組織から PrP^{Sc}を検出することにより確定診断される。これまでに、複数の BSE 検査キットが販売されているが、全て PrP^{Sc} 検出を指標にしている。ヒトプリオン病では、14-3-3 などが髄液中の蛋白質が診断補助マーカーとして使用されており、MRI が早期診断に有用であることが明らかとなってきたが、BSE をはじめとする動物プリオン病では、有用な診断補助マーカーはない と畜産の生前検査を可能にするためには、PrP^{Sc} 検出の高感度化とともに診断補助マーカーの探索も重要な課題である。

Key Words : プリオン / 牛海綿状脳症 / 診断法 / 異常型プリオン蛋白質

Development of BSE diagnosis methods and its current situation

Motohiro Horiuchi

Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University Professor

The causative agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs, prion diseases), called "prion", is thought to lack specific nucleic acids as a genome, and the major component of prion is believed to be an abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}). Since prion has no agent-specific nucleic acids, amplification of gene by PCR cannot be applicable for the detection of prion. In addition, it is difficult to disclose prion infected animal by serum diagnosis because PrP^{Sc} is encoded by host gene PrP and thus no immune response against PrP^{Sc} is induced in prion-infected animals. Conclusive diagnosis of BSE is mainly made by the detection of PrP^{Sc} in the central nervous system. In human prion diseases, certain proteins in cerebrospinal fluid such as 14-3-3, S100, and neuron-specific enolase, are now being used as surrogate markers. In addition, magnetic resonance imaging is useful for diagnosis of prion-affected patients in early clinical phase. However, no useful disease-specific markers have been developed in animal prion diseases. To accom-

plish an ante mortem diagnosis of BSE and other animal TSEs, it is important to develop ultra-high sensitive PrP^{Sc} detection methods and to find out reliable surrogate markers.

Key Words : prion / BSE / diagnosis / PrP^{Sc}

プリオン検出の概念

細胞変性効果(CPE)やプラークにより、ウイルスを検出したり、感染価(infectious dose; ID)を定量することができる。あるいは動物に接種して動物を致死させる量(lethal dose; LD)として定量化する場合もある。一方、プリオンは培養細胞では増殖効率が悪いために、培養細胞を用いた感染価の測定は難しい。

現在、プリオンの検出法として主に、1)プリオンの構成要素であるPrP^{Sc}(異常型プリオン蛋白質)を免疫生化学的手法により検出する、2)被検試料を実験動物に接種して病気の伝播を確認するバイオアッセイ、の2つの方法が用いられている。PrP^{Sc}の検出は、プリオンの構成要素の検出により間接的にプリオンの存在を判断するもので、プリオン病の確定診断に広く用いられている。バイオアッセイはプリオンの生物活性を指標にしている。

プリオン特異的な核酸は発見されていないので、PCR(polymerase chain reaction)による病原体特異的な核酸の増幅は応用できない。また、PrP^{Sc}は宿主遺伝子PrP(プリオン蛋白質)の産物であり、正常型プリオン蛋白質(PrP^C)と同一のアミノ酸配列を有することから、プリオン病罹患動物ではPrP^{Sc}に対する免疫応答がない。従ってプリオン病罹患動物・動物の血清診断はできない。

PrP^{Sc}検出法の原理(図1)

正常な動物の脳組織にはPrP^Cが発現している。一方、プリオンに罹患した動物の脳にはPrP^CとPrP^{Sc}の両方が存在する。免疫生化学的なPrP^{Sc}検出は、抗PrP抗体によりPrP^{Sc}を特異的に検出するものと誤解されることがあるが、使用する抗PrP抗体はPrP^CとPrP^{Sc}

の両方に反応する。より正確には、抗体は変性剤処理したPrP^CとPrP^{Sc}の両方に反応するので、抗PrP抗体では両者を区別できない。従って、試料調製の段階でPrP^Cを除去しておく必要がある。実際には、PrP^{Sc}とPrP^Cの蛋白質分解酵素感受性の差を利用して、Proteinase K(PK)処理によりPrP^Cを除去する。PrP^{Sc}は凝集体を形成しており、抗PrP抗体が認識するエピトープを露出していないので、凝集体を変性剤処理してPrP^{Sc}を変性させる。ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)ではグアニジン塩酸塩や尿素などで、ウエスタンブロット(WB)ではSDS(sodium dodecyl sulfate)によりPrP^{Sc}を変性させる。変性後のPrP^{Sc}を抗PrP抗体を用いて検出する。免疫組織化学では、切片を蒸留水に浸した状態で121℃、20分オートクレーブ処理することで、PrP^{Sc}が部分的に変性しエピトープが露出すると考えられる(hydrizing autoclave法)¹⁾。使用する抗PrP抗体の種類にもよるが、この処理は、135℃、2気圧というさらに厳しい条件がより効果的との知見も得られている²⁾。

BSE迅速検査用キットの評価

1998年にチューリッヒ大学からスピノフされたプリオニクス社が、世界初のBSE(bovine spongiform encephalopathy)検査キット"Pronics-Check"を販売した。WBによるBSE検査キットで、1999年にはスイスではこれを用いてBSE検査が開始された。その後、Bio-Rad社、Enfer社が、BSE検査キットを発売し、2000年から2001年にかけてEU諸国でBSE検査が実施されるようになった。ECではこれまでに、3度BSEの迅速検査法の評価を実施している(表1)。第一回の評価では4キット、第二回目は5キット、第三回目は10キットが評価を受けた^{3~5)}。第三回目の実

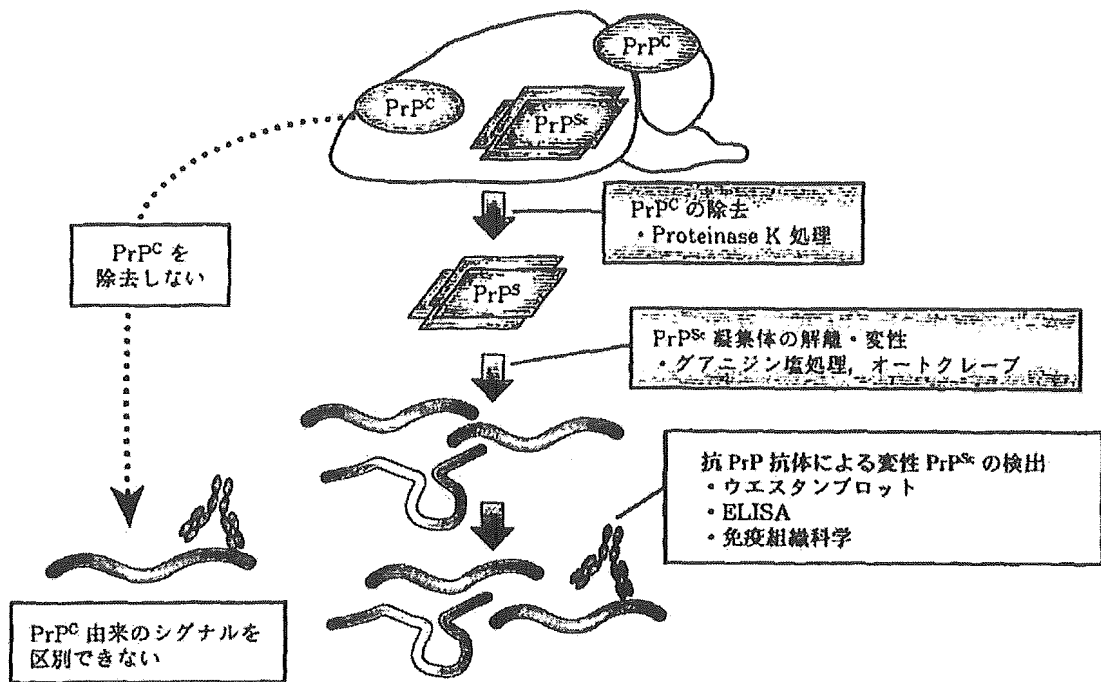


図1 PrP^{Sc}検出の原理

PrP^{Sc}は凝集しているため、抗PrP抗体で検出するためには、一度変性させる必要がある。PrP^C由来の分子に対する抗体の反応、PrP^{Sc}由来の分子に対する抗体の反応を区別することが出来ないため、変性前にPrP^Cの除去が必須である。

施例では、キットの基本性能を試験するフェーズI試験は、1) 感度 (diagnostic sensitivity) : BSE臨床例50検体中陽性と判定した割合、2) 特異性 (diagnostic specificity) : BSE陰性例150検体中陰性と判定した割合、3) 検出限界 (Detection limit) : BSE陽性牛の脳を陰性牛の脳で希釈した希釈列 (1:5, 1:50, 1:100, 1:200) の検出限界、の3種の試験から成る。フェーズI試験をクリアすると、10,000程度の検体、および200程度の質の劣化した検体を用いるフィールド試験に進む。これまでに12キットがフィールド試験を終了して、EC (現在はEuropean Food Safety Authority; EFSA) の承認を受けている。第三回の評価では日本の企業(富士レビオ株式会社)がエントリーして、フェーズI試験では良好な成績を得て、フィールド試験へ進んでいる。

これまでに開発されたキットは、ウエスタンブロット (Prionics-Check WB)、2種の抗体を使用する sandwich-ELISA で抗原抗体複合体を、i) 発色試薬で検出 (Platelia BSE Kit, FRELISA BSE など)、ii) 化

学発光試薬で検出 (Prionics-Check LIA, Institut Pourquier Speed'it など)、iii) あるいは時間分解蛍光測定で検出 (CDI)、PrP^{Sc} を選択的に結合するポリマーを使用した直接ELISA (Enfer BSE Kit, IDEXX HerdCheck BSE Atigen Test Kit)、filter-ELISA (CediTect BSE test)、イムノクロマト法 (Prionics-Check PrioSTRIP) に大別される (表1)。

各々のキットにはそれぞれ特徴がある。Platelia BSE Kit は試料調整の簡便化に成功した一例である。Enfer BSE Kit や IDEXX HerdCheck BSE は PrP^{Sc} を選択的に結合する化学物質をコートしたプレートを使用している点が特徴である。IDEXX 社のキットでは Microsens Biotechnology 社がライセンスを有する Seprion と呼ばれる化学ポリマーを使用している。この化学ポリマーは PrP^{Sc} に対する選択性が高いらしく、IDEXX 社のキットでは試料調整に PK を使用していない。全ての PrP^{Sc} が蛋白質分解酵素抵抗性ではなく、PK 処理により分解される PrP^S も存在する。従って、PK 処理を省くことでより多くの PrP^{Sc} が残存し、

表1 ECによるBSE迅速検査キットの評価

	会社など	キット名	原理/特徴	検出法	検出限界
第一回 (1999年) 4社	Prionics, Switzerland	Prionics-Check WB	WB	化学発光	10^{-1} (15/20)
	Enfer Technology, Ireland	Enfer TSE Kit	直接 ELISA	化学発光	$10^{-1.5}$ (20/20)
	CEA (Bio-Rad), France	Platelia BSE detection Kit	Sandwich-ELISA	発色	$10^{-2.5}$ (18/20)
第二回 (2002年) 5社	ID Lelystad, Netherlands	NA	Filter-assay/変性・未変性測定	化学発光	1:81 (4/4)
	Prionics, Switzerland	Prionics-Check LIA	Sandwich-ELISA	化学発光	1:243 (2/4)
	USDA (InPro), USA	aCDI	Sandwich-assay/変性・未変性測定/PTA沈殿	時間分解蛍光	$10^{-2.0}$ (2/4)
	MRC prion unit, Imperial College, UK	NA	Sandwich-assay	電子化学発光	1:270 (10/12)
第三回 (2004年) 10社	CEDI Diagnostic, Netherlands	CediTect BSE test	Filter-assay/変性・未変性測定	化学発光	> 1:200 (5/6)
	Fujirebio, Japan	FRELISA BSE	Sandwich-ELISA	発色	> 1:200 (6/6)
	IDEXX Laboratories, USA	IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit, EIA	直接 ELISA/PK 処理無	発色	1:800 (5/6)
	Institut Pourquier, France	Institut Pourquier Speed'it BSE	Sandwich-ELISA	化学発光	1:64 (4/5)
	Labor Diagnostik Leipzig GmbH, Germany	Priontype <i>post mortem</i>	Sandwich-ELISA/PK 処理無	発色	1:25 (4/4)
	Prionics, Switzerland	Prionics-Check PrioSTRIP	Lateral flow	目視	1:100 (16/16)
	Roboscreen GmbH, Germany	Roboscreen Beta Prion BSE EIA Test Kit	Sandwich-ELISA	発色	> 1:200 (6/6)
	Roche Diagnostica GmbH, Germany	Roche Applied Science PrionScreen	Sandwich-ELISA	発色	1:100 (10/12)
	Enfer Scientific, Ireland	Enfer TSE Kit v2.0 (autom. Sample prep.)	直接 ELISA	化学発光	> 1:200 (10/12)

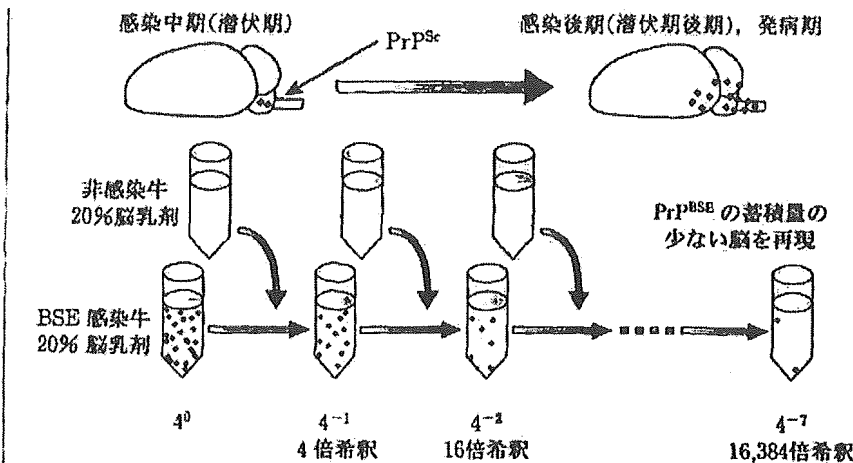
第一回から第三回まで、エントリーしたキットの中で、感度と特異性をクリアしたキットのみ表に示した。

それを選択的に回収可能ならば、検出感度の上昇につながる。CDIとCediTect BSE testでは、PrP^{Sc}を変性および未変性の条件で抗体との反応性を解析している点の特徴である。PrP^{Sc}は未変性条件下では抗PrP抗体のエピトープをあまり露出していないが、変性に伴いエピトープが露出し、抗体の反応性が上昇する。変性・未変性条件下で構造の変化に伴う抗体の反応性の差を測定することでS/N比の向上が見込まれる。In-Pro社はこの特徴から“CDI (conformation dependent immunoassay)”と呼んでいる。CDIでは、変性・未変性で測定する点を利用して、低濃度のPKを行い過剰なPrP^{Sc}の分解を避けている。PrP^{Sc}の濃縮にリンタンクスチン酸(PTA)を使用した点もCDIの特徴の一つである。PrioSTRIPはラテラルフロー法を使用しているが、ECの評価では検出限界が1:100程度と良好であることも注目に値する。

現在の技術水準では、感度および特異性は100%一致することは最低条件であり、検出限界がキットの性能を見極める判断材料となる。第一回、二回の評価では、 10^{-1} 以上の希釈列で検出限界を判断することができたが、第三回の評価では一部例外はあるが、原則希釈列を 10^{-2} までしか使用していないので真の検出限界を知ることは出来ない。三回の評価報告を総合的に判断すると、良好な検出限界を示すキットは1:200以上の希釈でも陽性の反応を呈している。つまり、BSE発症牛の延髄に蓄積しているPrP^{Sc}の1/200程度の量のPrP^{Sc}が蓄積している感染牛を摘発可能な感度を有している。

我が国のBSE確認検査と迅速検査キットの検出限

現在、我が国では、Platelia BSE Kit(Bio-Rad社)、



BSE 陽性検体	試験法	BSE 感染牛の希釈			
		4 ⁻³	4 ⁻⁴	4 ⁻⁵	4 ⁻⁶
BSE#4	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	-	-
BSE#5	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	-	-
BSE#6	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	-	-
BSE#7	WB	+	+	+	+
	PLATELIA	+	+	-	-
	OB-ELISA	+	+	-	-

図2 PrP^{Sc} 検出の検出限界

PrP^{Sc} が少量含まれる牛の脳を再現するために、BSE 感染牛の脳を非感染牛の脳で段階希釈し、PrP^{Sc} の検出限界を測定した(上)。Platelia BSE Kit, OB-ELISA, および確認検査用 WB の検出限界(下)。

Enfer TSE Test (Enfer 社), FRELISA BSE (富士レビオ社)のキットが BSE スクリーニングの一次検査に使用されている。これらで陽性あるいは擬陽性と判定された検体について、指定機関で確認検査を行っている。確認検査では WB, 免疫組織化学 (IHC), および病理組織学的検査を実施する。図 2 に Platelia BSE Kit, OB-ELISA (FRELISA BSE のプロトタイプ), および確認検査用 WB の検出限界を比較した結果を示した。英国 BSE 牛の脳を正常脳で 4 倍段階希釈した試

料から、それぞれの試料調整法に従って試料を調整し、PrP^{Sc} の検出を行った。Platelia BSE Kit と OB-ELISA は同等の検出限界を有していた。また、確認検査用の WB は両 ELISA と少なくとも同等～16 倍程度の検出限界を有していた。

図 3 に国内 4 例目と 7 例目の BSE の検査結果を示した。4 例目は ELISA の吸光度が 3.0 以上であり、確認検査でも WB および IHC で PrP^{Sc} の蓄積が確認でき、HE 標本でも神経細胞および神経網の空胞変性が認められた。一方、7 例目は ELISA の吸光度が 0.3 とカットオフ値よりも僅かに高いだけであった。確認検査では WB および IHC で明らかな陽性所見が認められたが、HE 標本では空胞変性は認められなかった。この例から、WB および IHC が確認検査として十分な感度を有していること、また、予想通り HE 標本では感度が低いことも確認できた。

プリオン高感度検出系

PrP^{Sc} の免疫生化学的検出法の感度は、プリオン感染価にするとの程度であろうか？ 一例として、表 2 にマウス PrP^{Sc} 検出とバイオアッセイから得られたプリオン感染価を比較した。OB ELISA (発色法) ではスクレイピー感染マウス脳の 4⁻⁷ 希釈 (920 ng 組織相当), OB-ELISA (化学発光) では 4⁻⁸ 希釈 (230 ng 組織相当) まで検出できた。バイオアッセイから得られた感染価に換算すると発色法で約 400 LD₅₀, 発光法で

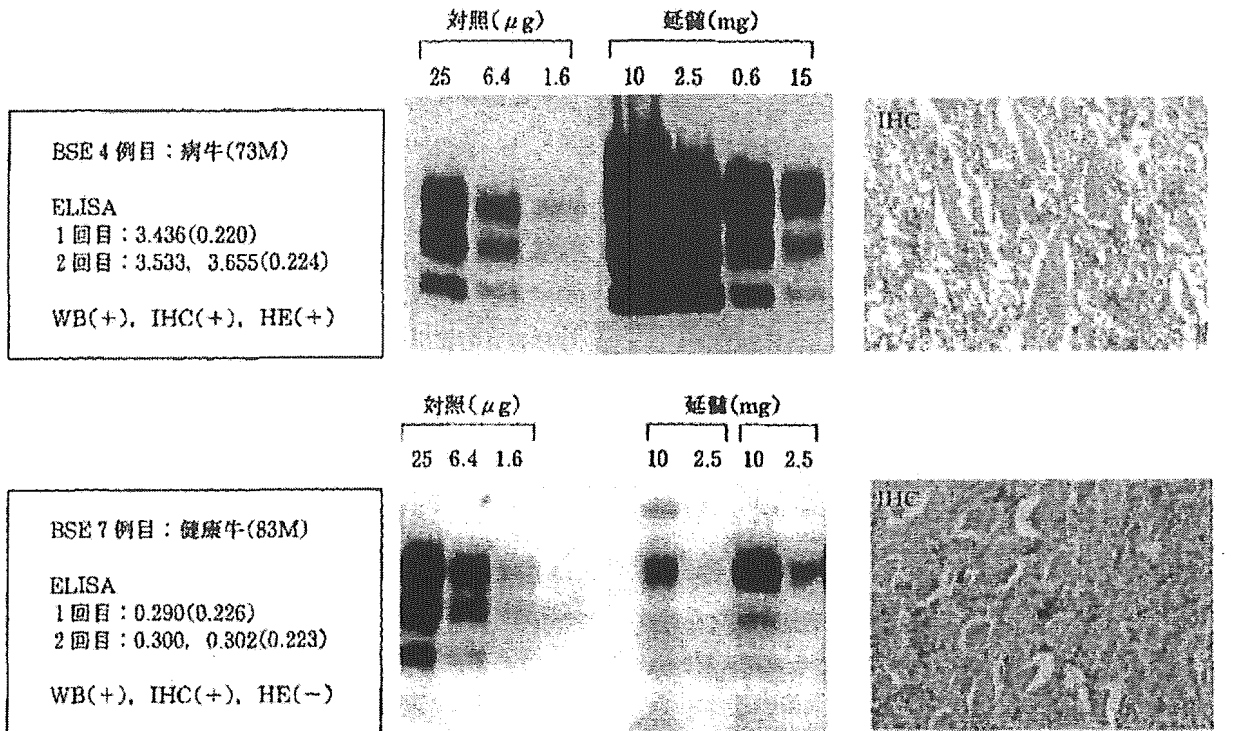


図3 BSE 検査結果

上段(国内4例目), 下段(国内7例目)。ELISAのカッコ内の値はカットオフ値。迷走神経背側核の免疫組織化学(IHC)を示した。7例目はELISAの値はカットオフ値よりも僅かに高い程度であるが、WB、IHCとも明らかに陽性像を呈した。

表2 OB-ELISAのPrP^{Sc}検出限界

検出方法	検出限界			検出限界	
	マウス脳希釈	組織当量 (ng)	感染価 (LD ₅₀) 換算値	BSE感染牛 延髄希釈	組織当量 (μg)
発色 (TMB)	4 ⁻¹	920	400	2 ⁻⁹	33
化学発光 (CSPD)	4 ⁻¹	230	100	2 ⁻¹¹ (= 10 ⁻¹³)	8
化学発光 (CSPD) + PTA 沈殿	4 ⁻¹	125 ~ 50	25	NT	NT

100 LD₅₀が検出限界である。試料調整にPTA沈殿法を導入すると¹⁾、さらに4倍感度が上昇した。つまり、現時点でELISAをベースにしたPrP^{Sc}の検出感度は、25 LD₅₀ということになる。高感度化の最終目標は1 LD₅₀のプリオンの検出に設定すると、10倍以上の高感度化を達成する必要がある。また、OB-ELISA(化学発光)でBSE感染牛脳からPrP^{Sc}を検出した場合、10⁻¹³(8 μg組織相当)希釈まで検出可能であった。BSE牛の材料はプリオン感染価のバイオアッセイのデータが十分でないので、感染価で表すことができ

ないが、計算上、BSE牛の脳に蓄積するPrP^{Sc}量の1/2,000が検出限界となる。

Platelia BSE Kitの牛PrP^{Sc}検出限界は1/300~1/1,000希釈で、RⅢマウスにおけるバイオアッセイと比較すると、同キットでのBSEプリオン検出限界は1 LD₅₀であった¹⁾。RⅢマウスは野生型マウスの中ではBSEに感受性が高い系統であるが、ウシPrP発現トランスジェニック(Tg)マウスを用いたバイオアッセイのほうが1,000倍程度感度が高いと考えられている¹⁾。SafarらはCDIでBSE牛の脳を10⁻¹⁴希釈して

も PrP^{Sc} を検出可能であり、CDI による PrP^{Sc} 検出感度はウシ PrP-Tg マウスを用いたバイオアッセイの検出感度は同程度であると報告している¹⁾。

Schmerr らは、蛍光標識 PrP ペプチドを用いた競合反応をキャピラリー電気泳動法で検出する方法で、羊や鹿の血液から PrP^{Sc} が検出可能であることを報告した²⁾。定量的なモデル実験の結果がないので検出感度を定量的に評価することはできないが、血液からプリオンを検出可能な高感度な方法として期待されている。また、Bieschke らは蛍光相互相関分光法で CJD (Creutzfeldt-Jakob Disease) 患者髄液から PrP^{Sc} を検出している³⁾。これも実用化が期待される技術である。

一般的にバイオアッセイによるプリオン検出は感度が高いと考えられているが、用いた動物が発症するまでには長期間を要する。北本らは、プリオン接種マウスの脾臓の濾胞樹状細胞 (FDC) に、接種後早期から PrP^{Sc} が検出できることに着目し、発症を待たずに、接種後一定期間で脾臓採取して PrP^{Sc} を検出することで、バイオアッセイによるプリオン検出を短縮化できることを示した。ヒト/マウスキメラ PrP をノックインしたマウスの腹腔内に孤発性 CJD の材料を接種した場合、 10^{-7} 希釈までプリオンが検出されている⁴⁾。ウシ PrP-Tg マウス、あるいはウシ PrP ノックインマウスで同様の方法により、高感度 BSE プリオン検出が可能となることが期待される。

生前診断法の開発

現行の BSE 診断法は、と畜後に延髄を採材して検査する。もし、血液などを材料として BSE 生前診断が可能ならば、と畜・解体前に感染の有無を判定できることから、より効率よく食肉の安全が保証される。また、BSE 汚染状況の把握や、牛の輸出入時に BSE フリーであることの証明も可能となるかもしれない。このような背景から、BSE 生前診断法の開発が求められているが、今のところ期待される方法はない。牛を対象とした場合、生前診断に使用可能な組織は、血液など限られた材料となる。これまでの研究報告を総合的に判断すると、PrP^{Sc} が扁桃や消化管付随リンパ装置などのリンパ系組織に検出される場合は、血液にもプリオンすると考えるのが自然である。実際に、スクレイピー

感染羊、BSE 感染羊、BSE 感染カニクイザル、vCJD 患者のリンパ系組織で PrP^{Sc} が検出でき、血液中に病気を伝達可能な量のプリオンが存在することが知られている。しかし、プリオンが血液中に存在したとしても微量であることから、血液から PrP^{Sc} を検出するには、血液に適した試料調整法を含めて、超高感度検出技術の開発が必要である。一方、BSE 感染牛におけるプリオンの局在はスクレイピー感染羊と比較して、中枢神経系組織への限局傾向が強く、PrP^{Sc} はリンパ系組織で殆ど検出されない⁵⁾。従って、BSE 感染牛の血液中にはプリオンが殆ど存在しない可能性もある。仮に超高感度 PrP^{Sc} 検出技術が実現できたとしても、血中 PrP^{Sc} の検出を指標とした BSE 生前検査法は現実的でないかもしれない。

PrP に限らず、プリオン感染により特異的に変化する分子は診断マーカーに成り得る。人プリオン病の診断では、髄液中の 14-3-3 蛋白、神経特異的エノラーゼ、S100 蛋白などが診断補助マーカーとして使用されている⁶⁾。また、MRI の拡散強調画像や FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) 画像が早期診断に応用されている⁷⁾。しかし、牛の検査を考えると、髄液の採取や MRI 検査は実用的ではない。

2001 年に、プリオン感染動物の骨髄や末梢血単核球で、赤芽球分化関連因子(後に遺伝子産物が α -ヘモグロビン安定化因子 [AHSP] であることが判明)の遺伝子発現が低下することが報告され、PrP 以外の診断マーカーとして診断への応用が期待された⁸⁾。しかし現在まで、AHSP が BSE 感染の診断マーカーとして機能するかは不明である。また、2001 年にプリオン感染動物の尿中に蛋白質分解酵素抵抗性の PrP が検出されることが報告され、尿検査によるプリオン感染診断法開発の機運が高まった⁹⁾。しかし、尿中 PrP と目されていた蛋白が、細菌の外膜蛋白である可能性も指摘されており、尿中 PrP の存在自体も不透明な状況にある¹⁰⁾。

おわりに

10 以上の BSE 迅速検査キットが開発された。その中でも性能の良いキットは、迅速検査用としては、PrP^{Sc} 検出感度が比較的高いという印象を持つ。より簡便で高感度な診断法は理想であるが、一足飛びに達

成できるものではない。今後、BSEを含めた動物プリオン病の診断法の開発は、1)感度を損なうことなく簡便化を図る、2)試料調整が煩雑、あるいは高価な測定機器が必要でも高感度化を押し進める、3)PrP^{Sc}以外の診断マーカーを標的とした生前診断法の開発、の3つの方向性があると思われる。BSE生前診断法の開発への要望が多く聞かれるが、ここ数年で実用的なものが開発される見込みは低い。有用な診断マーカーの発見など、研究面でのブレイクスルーに期待したい。

謝辞

英国 BSE 牛脳材料を分与いただいた動物衛生研究所・プリオン病研究センター・横山隆博士に感謝致します。また、PrP^{Sc} 検出感度に関する試験は、厚生労働科学研究費の補助を受けて実施したものです。

【文 献】

- 1) Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, et al.: Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 65 : 6292-6295, 1991
- 2) Furuoka H, et al.: Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol* 109 : 263-271, 2005
- 3) Moynagh J, Schimmel H, & Kramer GN: The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission, 1999
- 4) Schimmel H, et al.: The evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2nd study), European Commission, 2002
- 5) Philipp W, et al.: The evaluation of 10 rapid post mortem tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines, European Commission, 2004
- 6) Safar J, et al.: Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med* 4 : 1157-1165, 1998
- 7) Deslys JP, et al.: Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 409 : 476-478, 2001
- 8) Safar JG, et al.: Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20 : 1147-1150, 2002
- 9) Schmerr MJ, et al.: Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatogr A* 853 : 207-214, 1999
- 10) Bieschke J, et al.: Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 5468-5473, 2000
- 11) Kitamoto T, et al.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem Biophys Res Commun* 297 : 280-286, 2002
- 12) The Scientific Steering Committee: TSE infectivity distribution in ruminant tissues (state of knowledge, December 2001), European Commission, 2002
- 13) Zerr I & Poser S: Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests. *APMIS* 110 : 88-98, 2002
- 14) Collie DA, et al.: Diagnosing variant Creutzfeldt-Jakob disease with the pulvinar sign: MR imaging findings in 86 neuropathologically confirmed cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 24 : 1560-1569, 2003
- 15) Miele G, Manson J, & Clinton M: A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med* 7 : 361-364, 2001
- 16) Shaked GM, et al.: A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 276 : 31479-31482, 2001
- 17) Furukawa H, et al.: 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

2. 人獣共通感染症としてのプリオン病

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

1996年に変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)の存在が報告されてから、プリオン病は人獣共通感染症と認識されるようになった。2001年には我が国でもBSE感染牛が見つかり、大きな社会問題となった。欧州におけるBSE発生は減少傾向にあり、英国におけるvCJDの発生も減少傾向が認められるが、欧州以外の国でのBSEの発生、輸血によるvCJDの伝播、日本におけるvCJD患者の発生など、危惧していたことが次々に現実となった。BSEの感染拡大防止と撲滅には、BSEスクリーニング/サーベイランス、特定危険部位の除去、飼料規制の継続が必要である。また、輸血用血液、医薬品原料などのプリオン汚染を摘発して排除するためには、高感度プリオン検出技術の開発が望まれる。さらに、人プリオン病の治療法確立も重要な課題である。

vCJDの発生状況

vCJDの発生数を図1に示した。英国では2004年から減少傾向が認められる。これまでにvCJDを発症した患者はPrP^{Sc}コドン129のアミノ酸多型がM/Mであるので、M/Mタイプの人における発生はこのまま減少していくかもしれない。一方、英国で虫垂あるいは扁桃除去手術の試料を免疫組織化学により調べた結果、3/12,674がPrP^{Sc}陽性であった。この結果を英国の人口に外挿すると、3,800名程度の感染者が存在するという試算も報告されている¹⁾。

英国以外では、フランスで11例、イタリア2例、アイルランド、カナダ、アメリカ各1例、2005年に入り、オランダ、日本でvCJD患者が報告された。日本のvCJD症例は、短期間の英国滞在中に感染を受けたと考えられている。食肉等を介する場合、感染成立は、摂取量や摂取形態のみならず、侵入門戸への到達などの確率論にも依存する。短期間の滞在中に感染を受ける可能性も十分に考えられる。あるいは、PrP以外にvCJDの感受性に関与する遺伝背景や

環境要因があるかもしれない。英国の虫垂の検索結果と合わせて、潜在的なvCJD感染の可能性を軽視できる状況ではないと思われる。

BSE実験感染羊の血液の輸血により病気が伝達されたことから、輸血によるvCJDの伝播が危惧されていたが、現実のものとなった。一例(PrP^{Sc}コドン129:M/M)は、献血の3年半後にvCJDを発症した人由来の赤血球を輸血された6年半後にvCJDを発症した²⁾。もう一例(PrP^{Sc}コ

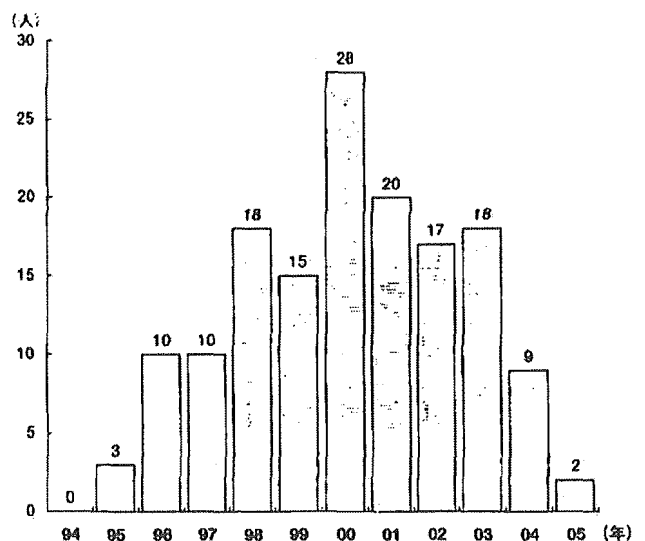


図1 英国におけるvCJD患者数の推移

連絡先

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目
TEL: 011-706-5293
FAX: 011-706-5293
E-mail: horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

ン129：M/V)は、献血の18ヶ月後にvCJDを発症した人由来の赤血球を輸血された人で、5年後に腹大動脈瘤破裂により死亡した。この患者の脾臓からPrP^{Sc}が検出されたが、脳からは検出されなかった³⁾。この患者が将来vCJDを発症したかは知ることができない。しかしこの事例から、PrPコドンM/VあるいはV/Vの人がvCJDに感染する可能性は否定できなくなった。

BSEの発生状況

英国では1992年をピークにBSEの発生が減少していたが、2004年について年間の発生が1,000頭を割った。また、EU諸国でも発生数は減少傾向にある⁴⁾。一方、カナダ、イスラエル、日本、アメリカ、とEU以外の国でもBSE感染牛が摘発されており、EU以外にも感染は拡大している。汚染状況が低いと考えられる地域では、BSEのサーベイランスを強化しない限り、真の汚染状況は判らない。

日本では2001年9月に一例目が確認された。翌10月には、食肉に供される牛全頭と対象とした検査が開始され、2004年4月から、24ヶ月齢以上の死亡牛全頭を対象とした検査が完全に実施された。BSE発生頻度が高い死亡牛の検査の開始が遅れたことが、我が国のBSE汚染状況を把握する上で障害となったのは残念である。これまで、約450万頭以上が検査され、17頭のBSE感染牛が摘発された⁵⁾。

当初摘発されていた牛は1995～96年にかけて生まれた

個体であったことから、この時期にリスクが一時的にあったとも考えられた。しかし、2004～2005年の検査では、1999～2000年に生まれた牛3頭が摘発されたことから、その後も感染源が国内に存在したことが明らかとなった(図2)。1999～2000年生まれのBSE牛の感染源が、国内のBSEがレンダリングを経てリサイクルされた結果なのか、海外からの飼料などの輸入によるものかは判らない。BSEの潜伏期は4～6年であり、汚染度が低ければ潜伏期は長くなることから、2000年以降に生まれた牛がBSE好発年齢に入るのは今後である。また、2001年の肉骨粉等動物由来飼料使用の法規制後に生まれた牛でのBSE発生頻度により、規制の実効性と規制後のBSE汚染状況が明確になると思われる。従って2001年以降に生まれた牛がBSE好発年齢に達するまでは、対象となる牛のBSEサーベイランスは継続する必要がある。BSEの感染源は飼料と考えられる。肉骨粉の使用は2001年に法的に規制された。国内で使用している飼料に占める輸入配合飼料の割合は0.5%程度と低いが、輸入配合飼料の規制は殆どない。仮に国内での動物由来飼料の規制が効果を発揮していると考えれば、海外からの汚染源の侵入を断つことに一層の注意を払う必要がある。

日本ではBSE被疑牛からBSE感染牛が摘発された例はない。これまで摘発された24ヶ月齢以上のBSE感染牛は、健康牛としてと畜場で処理されたものが5頭、と畜場で病

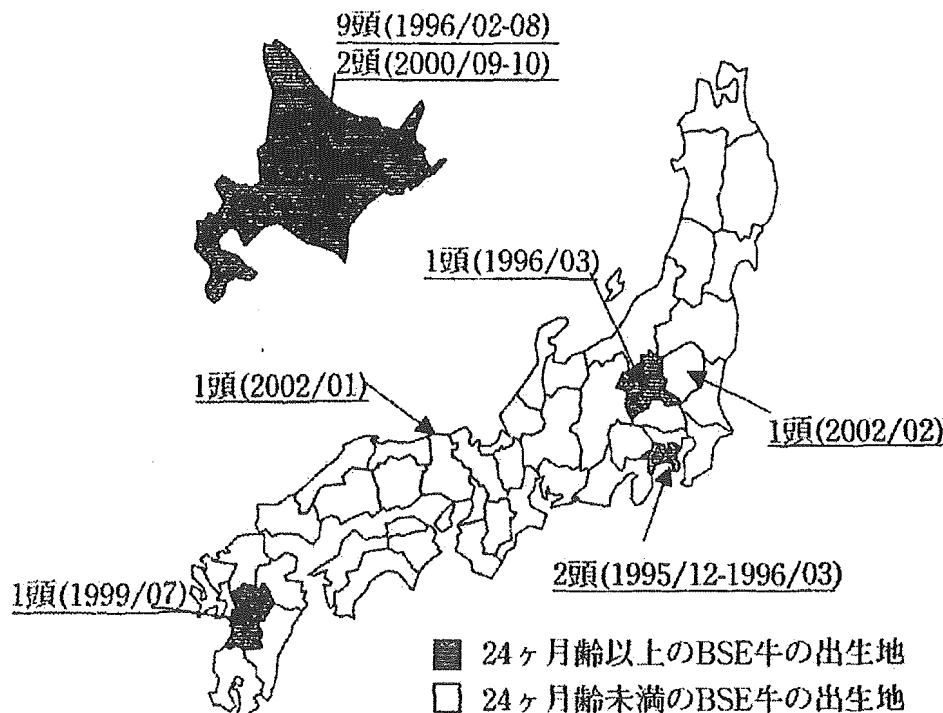


図2 日本のBSE牛の出生地と出生時期

畜として処理された個体が5頭、死亡牛などの検査で摘発された個体が5頭である。と畜場で病畜として処理された牛および死亡牛は、EUではリスク牛に分類される。EUの分類に拠って日本のBSEの発生頻度を計算すると、リスク牛で20倍ほど高いことがわかる(表1)。

BSE 迅速検査用キットとその評価

1998年にプリオニクス社が、世界初のBSE検査キット“Prionics-Check”を販売した。その後、Bio-Rad社、Enfer社が、BSE検査キットを発売し、2000年から2001年にかけてEU諸国でBSE検査が実施されるようになった。ECでは3度BSEの迅速検査法の評価を実施し、これまでに19キットが評価を受けた(表2)⁶⁻⁸⁾。そのうち12キットがフィールド試験を終了して、EC(現在はEuropean Food Safety Authority, EFSA)の承認を受けている。

BSE迅速検査キットは、ウエスタンブロット(Prionics-Check WB)、2種の抗体を使用するsandwich-ELISA(Platelia BSE Kit, FRELISA BSE, Prionics-Check LIA, aCDIなど)、PrP^{Sc}を選択的に結合するポリマーを使用した直接ELISA(Enfer BSE Kit, IDEXX HerdCheck BSE Atigen Test Kit)、filter-ELISA(CediTect BSE test)、イムノクロマト法(Prionics-Check PrioSTRIP)に大別される(表2)。各々のキットにはそれぞれ特徴がある。Platelia BSE Kitは試料調整の簡便化に成功した一例である。Enfer BSE KitやIDEXX HerdCheck BSEはPrP^{Sc}を選択的に結合する化学物質をコートしたプレートを使用している点の特徴である。IDEXX社のキットではMicrosens Biotechnology社がライセンスを有するSeprionと呼ばれる化学ポリマーを使用している。この化学ポリマーはPrP^{Sc}に対する選択性が高いらしく、IDEXX社のキットでは試料

表1 我が国のBSE陽性率

区分	A	B	A+B	C
	農水 死亡牛など (24ヶ月齢以上)	厚労 病牛としてと畜 (24ヶ月齢以上)	EUのリスク牛に 相当する集団 (24ヶ月齢以上)	厚労 健康牛としてと畜 (30ヶ月齢以上)
検査頭数	145,373	19,879	165,252	1,740,937
BSE陽性牛数	5	5	10	5
陽性率(100万頭当たり)	34.4	251.5	60.5	2.9

表2 ECによるBSE迅速検査キットの評価

	会社など	キット名	原理/特徴	検出法	検出限界
第一回 (1999年) 4社	Prionics, Switzerland	Prionics-Check WB	WB	化学発光	10 ⁻¹ (15/20)
	Enfer Technology, Ireland	Enfer TSE Kit	直接 ELISA	化学発光	10 ^{-1.5} (20/20)
	CEA (Bio-Rad), France	Platelia BSE detection Kit	Sandwich-ELISA	発色	10 ^{-2.5} (18/20)
第二回 (2002年) 5社	ID Lelystad, Netherlands	NA	Filter-assay / 変性・未変性測定	化学発光	1: 81 (4/4)
	Prionics, Switzerland	Prionics-Check LIA	Sandwich-ELISA	化学発光	1: 243 (2/4)
	USDA (InPro), USA	aCDI	Sandwich-assay / 変性・未変性測定/PTA沈殿	時間分解蛍光	10 ^{-2.0} (2/4)
	MRC prion unit, Imperial College, UK	NA	Sandwich-assay	電子化学発光	1: 270 (10/12)
第三回 (2004年) 10社	CEDI Diagnostic, Netherlands	CediTect BSE test	Filter-assay / 変性・未変性測定	化学発光	>1: 200 (5/6)
	Fujirebio, Japan	FRELISA BSE	Sandwich-ELISA	発色	>1: 200 (6/6)
	IDEXX Laboratories, USA	IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit, EIA	直接 ELISA / PK処理無	発色	1: 800 (5/6)
	Institut Pourquier, France	Institut Pourquier Speed'it BSE	Sandwich-ELISA	化学発光	1: 64 (4/5)
	Labor Diagnostik Leipzig GmbH, Germany	Priontype post mortem	Sandwich-ELISA / PK処理無	発色	1: 25 (4/4)
	Prionics, Switzerland	Prionics-Check PrioSTRIP	Lateral flow	目視	1: 100 (16/16)
	Roboscreen GmbH, Germany	Roboscreen Beta Prion BSE EIA Test Kit	Sandwich-ELISA	発色	>1: 200 (6/6)
	Roche Diagnostics GmbH, Germany	Roche Applied Science PrionScreen.	Sandwich-ELISA	発色	1: 100 (10/12)
Enfer Scientific, Ireland	Enfer TSE Kit v2.0 (autom. Sample prep.)	直接 ELISA	化学発光	>1: 200 (10/12)	

第一回から第三回まで、エントリーしたキットの中で、感度と特異性をクリアしたキットのみ表に示した

調整に PK を使用していない。aCDI と CediTect BSE test では、PrP^{Sc} を変性および未変性の条件で抗体との反応性を解析する。PrP^{Sc} は未変性条件下では抗 PrP 抗体のエピトープをあまり露出していないが、変性に伴いエピトープが露出し、抗体の反応性が上昇する。変性・未変性条件下で構造の変化に伴う抗体の反応性の差を測定することで S/N 比の向上が見込まれる。InPro 社はこの特徴から “CDI (conformation dependent immunoassay)” と呼んでいる。PrP^{Sc} の濃縮にリンタングステン酸 (PTA) を使用した点も aCDI の特徴の一つである⁹⁾。

現在の技術水準では、感度および特異性は 100% 一致す

ることは最低条件であり、検出限界がキットの性能を見極める判断材料となる。三回の評価報告を総合的に判断すると、良好な検出限界を示すキットは 1 : 200 以上の希釈でも陽性の反応を呈している。つまり、BSE 発症牛の延髄に蓄積している PrP^{Sc} の 1/200 程度の量の PrP^{Sc} が蓄積している感染牛を摘発可能な感度を有している。

PrP^{Sc} の検出感度

図 3 に国内 4 例目と 7 例目の BSE の検査結果を示した。4 例目は ELISA の吸光度が 3.0 以上であり、確認検査でも WB および IHC で PrP^{Sc} の蓄積が確認でき、HE 標本でも

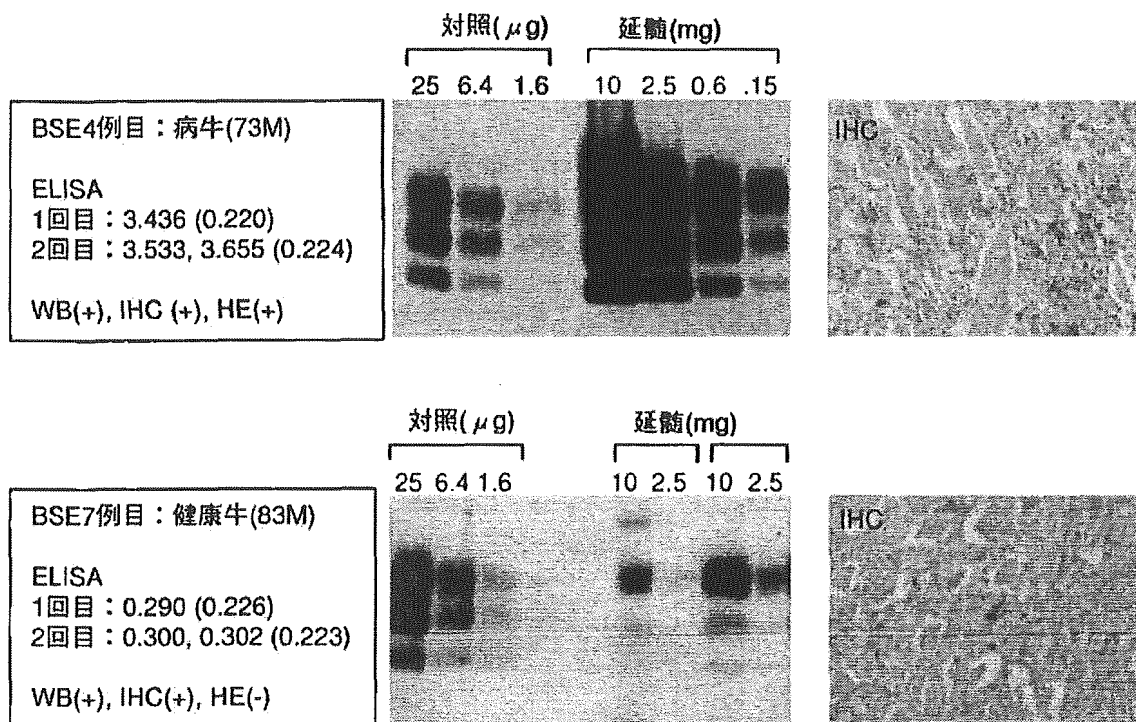


図 3 BSE 検査結果

上段 (国内 4 例目), 下段 (国内 7 例目)。ELISA のカッコ内の値はカットオフ値。迷走神経背側核の免疫組織化学 (IHC) を示した。7 例目は ELISA の値はカットオフ値よりも僅かに高い程度であるが、WB, IHC とも明らかに陽性像を呈した。

表 3 PrP^{Sc} の検出限界

		OB-ELISA			WB
		発色 (TMB)	化学発光 (CSPD)	化学発光 (CSPD) + PTA 沈殿	
マウス スクレイパー	脳希釈	4 ⁷	4 ⁸	4 ⁹	NT
	組織当量 (ng)	920	230	125 ~ 50	NT
	感染価 (LD ₅₀)	400	100	25	NT
BSE 牛	延髄希釈	2 ⁹	2 ¹¹ (=10 ^{3.3})	NT	NA
	組織当量 (μg)	33	8	NT	2 ~ 8

神経細胞および神経網の空胞変性が認められた。一方、7例目はELISAの吸光度が0.3とカットオフ値よりも僅かに高いだけであった。確認検査ではWBおよびIHCで明らかな陽性所見が認められたが、HE標本では空胞変性は認められなかった。この例から、WBおよびIHCが確認検査として十分な感度を有していること、また、予想通りHE標本による検索は感度が低いことも確認できた。

PrP^{Sc}の免疫生化学的検出法の感度は、プリオン感染価にするとの程度であろうか？一例として、表3にOB-ELISA (FRELISA BSEのプロトタイプ) によるPrP^{Sc}検出とバイオアッセイから得られたプリオン感染価を比較した結果を示した。OB-ELISA (発色法) ではスクレイピー感染マウス脳の4⁷希釈 (920 ng 組織相当)、OB-ELISA (化学発光) では4⁸希釈 (230 ng 組織相当) まで検出できた。バイオアッセイから得られた感染価に換算すると発色法で約400 LD₅₀、発光法で100 LD₅₀が検出限界である。試料調整にリンタングステン酸 (PTA) 沈殿法を導入すると⁹⁾、さらに4倍感度が上昇した。つまり、現時点でELISAをベースにしたPrP^{Sc}の検出感度は、25 LD₅₀程度ということになる。また、OB-ELISA (化学発光) でBSE感染牛脳からPrP^{Sc}を検出した場合、10^{3.3} (8 μg 組織相当) 希釈まで検出可能であった。計算上、BSE牛の脳に蓄積するPrP^{Sc}量の1/2000が検出限界となる。また、確認検査用WBでは検出限界はBSE発症牛脳2~8 μg 組織相当であった。試料調整法にPTA沈殿法などを導入してさらに濃縮すると、一レーンあたりにアプライできる組織当量が増すので、WBの感度がさらに上昇する。このように高感度化したWBを用いて、日本で発生したBSE牛の末梢神経、副腎などでもPrP^{Sc}が僅かに検出されている¹⁰⁾。

Platelia BSE Kitの牛PrP^{Sc}検出限界は1/300~1/1,000希釈で、RIIIマウスにおけるバイオアッセイと比較した場合、同キットでのBSEプリオン検出限界は1LD₅₀程度と報告されている¹¹⁾。RIIIマウスは野生型マウスの中ではBSEに感受性が高い系統であるが、ウシPrP発現トランスジェニック (Tg) マウスを用いたバイオアッセイのほうが1000倍程度感度が高いと考えられている¹²⁾。SafarらはCDIでBSE牛の脳を10⁴希釈してもPrP^{Sc}を検出可能であり、CDIによるPrP^{Sc}検出感度はウシPrP-Tgマウスを用いたバイオアッセイの検出感度と同程度であると報告している¹²⁾。

PrP^{Sc}の増殖抑制とプリオン病治療薬の候補

PrP^{Sc}の蓄積を阻害する物質は、プリオンの増殖を抑えると考えられることから、プリオン病の治療薬の候補となり得る。これまでに、プリオン持続感染神経芽細胞 (Sc⁺MNB) を用いて、多くの候補が得られている。硫酸アキストランや硫酸ペントサンなどの硫酸多糖体¹³⁾、ポリエーテル系抗生物質¹⁴⁾、ホルフィリン誘導体¹⁵⁾、キナクリンなどのアクリジン誘導体^{16,17)}、クロロプロマジンなどのフェノチアジン誘導体¹⁷⁾、分枝ポリアミン¹⁸⁾、システインプロテアーゼインヒビター¹⁶⁾、タンニン酸などのポリフェノール類¹⁹⁾、アミロイド結合性色素²⁰⁾、PrPペプチド²¹⁾、β-breaker peptide²²⁾、変異PrP²³⁾、siRNA²⁴⁾、抗PrP抗体など、数多くの例が挙げられる。これらの一部は、in vivoでも試験されているが、予防という観点からは効果が期待できるものがあるが、治療という観点からは、現状では効果が期待できるものは多くない。今後、候補物質の作用機序の解析、投与方法や薬物動態の検討などを進めるこ

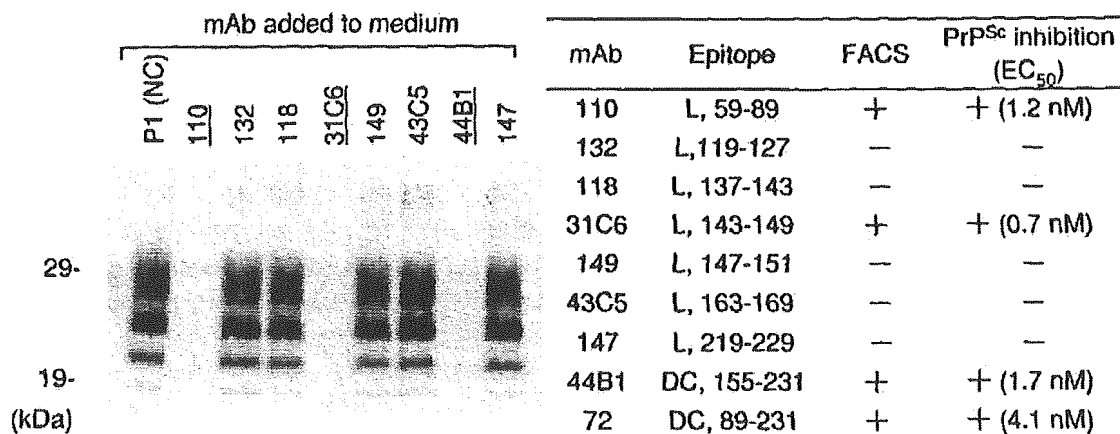


図4 抗PrP抗体によるPrP^{Sc}産生抑制

プリオン持続感染マウス神経芽細胞を抗PrP抗体で処理後にPrP^{Sc}をWBにより検出した (左)。表には、抗体が認識するエピトープ、細胞膜上PrP^Cとの反応性 (FACS)、およびPrP^{Sc}産生抑制のED₅₀を示した。Lは連続エピトープ、DCは非連続エピトープ。

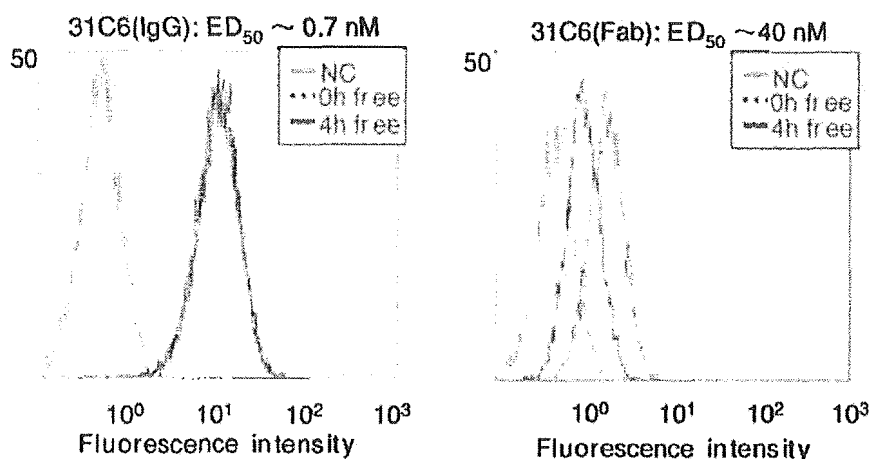


図5 PrP^C-抗体複合体の動態

マウス神経芽細胞を mAb31C6 (IgG), およびその Fab'フラグメント存在下で1時間培養後直ちに (0 hr), あるいは抗体除去後に抗体非存在下で細胞を4時間培養し (4 hr), PrP^C-抗体複合体を FACS により検出した。

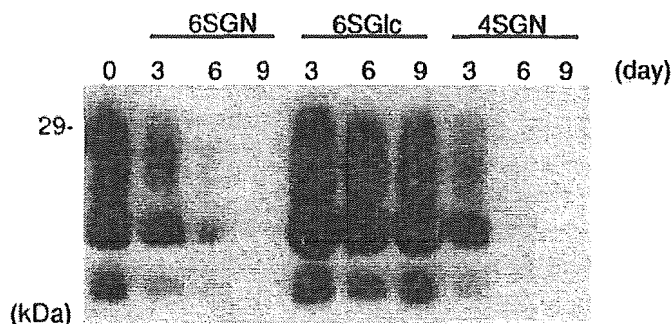


図6 人工合成硫酸化糖による PrP^{Sc} 産生抑制

プリオン持続感染マウス神経芽細胞を合成硫酸化糖存在下で培養後に, PrP^{Sc} を WB により検出した。6SGN: 6-sulfo-GlcNAc; 4SGN: 4-sulfo-GlcNAc; 6SGlc: 6-sulfo-Glc.

とで, 効果的な治療法が見つかることが期待される。本稿では抗 PrP 抗体と硫酸多糖体の PrP^{Sc} 産生抑制について述べる。

1) 抗 PrP 抗体の抗プリオン活性

PrP の第一 α ヘリックスと反応する抗体を Sc⁺NMB 培養液に添加して培養すると, PrP^{Sc} が消失することが報告された^{25,26)}。筆者らは9種の異なるエピトープを認識する抗 PrPmAb パネルを用いて同様の実験を行なったところ, mAb が認識するエピトープとは関係なく, 細胞膜上の PrP^C と強く反応する mAb に PrP^{Sc} 増殖抑制効果が認められた (図4)²⁷⁾。抗体が PrP^C と結合すると抗体-PrP^C 複合体が細胞膜上に停留する。抗体を Fab' にすると, Fab-PrP^C 複合体の細胞膜上の停留は IgG に比べると弱く, PrP^{Sc} 産生抑制効果も減少する (図5)。これらの結果は, 抗体が結合すると PrP^C が通常の分解経路に移行せず, PrP^{Sc} 産生の基質と

なる PrP^C が供給されなくなることが, 抗 PrP 抗体の PrP^{Sc} 増殖抑制の機構の一つであることを示唆している。勿論, 抗体が PrP^C 上の特定のエピトープに結合することで, PrP^C 上にある PrP^{Sc} への結合ドメインをブロックする結果, PrP^C が PrP^{Sc} に結合できなくなる可能性もある。細胞内において PrP^{Sc} は生成と分解が行われており, 基質 (PrP^C) の供給が不十分になると PrP^{Sc} は分解されて消失すると考えられる。

抗 PrP 抗体がプリオン感染を防御することも報告されている。mAb6H4 を B 細胞上に IgM として発現する Tg マウスは, プリオンの腹腔内接種に抵抗性となる²⁸⁾。この Tg マウスでは脾臓に PrP^{Sc} の蓄積が認められないので, 末梢組織におけるプリオンの感染成立を阻害していると考えられる。また, 抗 PrP 抗体の受動免疫が末梢からのプリオン感染を病御できる²⁹⁾。プリオンを腹腔内接種後, 7~30日

後に受動免疫を開始しても防御効果がある。受動免疫を開始した時点では既に脾臓で PrP^{Sc} が検出されることから、末梢のリンパ系組織では感染が成立している。しかし発病を阻止できることから、抗 PrP 抗体の受動免疫は、プリオンが末梢組織から中枢神経系組織へ侵入する過程を阻止すると思われる。この受動免疫ではプリオンの脳内接種に対する防御効果ない。プリオンを末梢から感染させる以前に組換え PrP 免疫した場合には防御効果はあるが、プリオン接種後に免疫しても防御効果は殆ど認められない³⁰⁾。従ってこれらの結果は、抗 PrP 抗体がプリオン感染初期の段階を標的とした予防法開発に応用可能であることを示唆している。

2) 硫酸化糖の抗プリオン活性

硫酸デキストランや硫酸ペンタosan (PPS) などの硫酸化糖は、プリオン接種と同時に投与すると、プリオン感染を防御することが古くから報告されていた^{31,32)}。その後、硫酸化糖が Sc⁺MNB の PrP^{Sc} 増殖を阻害することも報告された¹³⁾。硫酸化糖の PrP^{Sc} 増殖抑制機構として、PrP^C のエンドサイトーシスを促進して PrP^C の分解を促進するなど、PrP^C の代謝経路に影響をおよぼす可能性が示唆されている^{27,33)}。しかしポリアニオンという性質から、末梢から投与しても血液脳関門の通過は期待できない。堂浦らは、PPS の脳室内投与が、プリオン感染マウスで有意な延命効果があることを報告した³⁴⁾。この発見をもとに、英国で人プリオン病患者の PPS 投与が開始されている。GAG のような天然型の硫酸化糖は硫酸化部位がランダムに硫酸化されているので、構造活性相関を解析することが困難である。硫酸化糖の抗プリオン活性に重要な基本構造が判るならば、より高い抗プリオン活性を持つ硫酸化糖の開発につながることを期待できる。筆者らは、部位特異的に硫酸基やアセチル基が配座する人工合成硫酸化糖とそのポリマーの PrP^{Sc} 産生抑制効果について検討しているが、4 位または 6 位の硫酸基と 2 位の N-アセチル基を有するグルコース配糖体が PrP^{Sc} 産生抑制活性があることを見出している (図 6, 未発表)。

おわりに

“プリオン” の概念が提唱されてから 20 年以上が経過した。難解な感染症の病原体の謎も徐々に紐解かれつつある。しかし、プリオンおよびプリオン病に対峙するためには、プリオン増殖の分子機構解明、神経変性機序の解明など、一層の基礎研究の進展が不可欠である。我が国では、今後数年間は BSE 感染牛が散発的に摘発されることが予想される。BSE の感染拡大防止には、BSE スクリーニング/サーベイランス、特定危険部位の除去、飼料規制を継続する必要がある。BSE は牛から人へ感染が拡大し、さらに輸血により人から人へ感染が広がることも明らかとなった。医薬品原料などのプリオン汚染の評価、その他の汚染源の摘発

のためには、高感度プリオン検出技術の開発が望まれる。

脳内の PrP^{Sc} 増殖を抑えることで、病気の進行を抑制できるかもしれない。培養細胞レベルの実験系では PrP^{Sc} 増殖抑制活性を有する物質が数多く報告されている。しかし、血液-脳関門の通過、あるいは毒性の問題など、治療法開発には多くの課題が残されている。今後は、in vivo の試験により、これらの問題を解決し、実用的かつ効果的な治療法の模索に力を注ぐ必要がある。PrP^{Sc} の増殖阻害により病気の進行は抑えられるかもしれないが、回復を考えた場合、変性した神経組織の再生も考慮する必要がある。PrP^{Sc} の増殖抑制効果と神経再生効果を併せ持つ治療法は、効果的な治療法を提供するかもしれない。

謝 辞

研究材料および情報を提供いただいた、動物衛生研究所・プリオン病研究センター・品川森一、横山隆、国立感染症研究所・佐多徹太郎、山河芳男、の諸先生に感謝致します。また、ここに示した結果の一部は、帯広畜産大学・古岡秀文、名古屋大学・西田芳弘、産業技術総合研究所・嶋沢浩隆、の諸先生との共同研究によるものです。

文 献

- 1) Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW. : Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 203: 733-739, 2004.
- 2) Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. : Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421, 2004.
- 3) Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. : Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364: 527-529, 2004.
- 4) OIE : Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm
- 5) 牛海綿状脳症 (BSE) 関係 | ホームページ (Q & A など) <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/bse.html>
- 6) The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission, 1999.
- 7) The evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2ND study), European Commission, 2002.
- 8) The evaluation of 10 rapid post mortem tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines, European Commission, 2004.
- 9) Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. : Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat*

原 著

C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための 第一次国内標準品の作製

水沢左衛子^{1 b)} 岡田 義昭^{1 b b)} 堀内 善信^{2 b)} 田中 建志^{3 b)}
佐藤 功栄^{3 b)} 金子 健二^{4 b b)} 佐々木祐子^{5 b)} 田中 利明^{6 b)}
伴野 丞計^{7 b)} 友水 健雄^{4 b)} 速水 照一^{5 b b)} 土方美奈子^{8 b b)}
平子 一郎^{9 b b b)} 真弓 忠^{10 b)} 三上 貢一^{11 b b b)} 三代 俊治^{8 b b)}
宮本 誠二^{12 b b)} 牟田 健吾^{12 b)} Thomas Weimer^{13 b)}
Todd Gierman^{14 b)} 小室 勝利^{1 b)} 山口 照英^{15 b)}

¹国立感染症研究所血液・安全性研究部, ²国立感染症研究所細菌第二部, ³埼玉県赤十字血液センター,
⁴日本製薬株式会社, ⁵株式会社ベネシス, ⁶バクスター株式会社バイオサイエンス事業部,
⁷日本赤十字社血漿分画センター, ⁸東芝病院研究部, ⁹バイエル薬品株式会社, ¹⁰自治医科大学,
¹¹アベンティス ファーマ株式会社, ¹²財団法人化学及血清療法研究所, ¹³アベンティス ベーリング,
¹⁴バイエルヘルスケア, ¹⁵国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部,
^a血液事業部会安全技術調査会 血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会
(委員長: 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英),
^bNAT 国内標準品作製のための共同研究グループ
^c現国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部,
^d現シェリング・プラウ株式会社, ^e現バイエル薬品株式会社

(平成17年1月5日受付)

(平成17年5月6日受理)

ESTABLISHMENT OF THE FIRST NATIONAL STANDARD FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY ASSAY FOR HCV RNA

Saeko Mizusawa^{1 b)}, Yoshiaki Okada^{1 b b)}, Yoshinobu Horiuchi^{2 b)}, Takeshi Tanaka^{3 b)},
Koei Sato^{3 b)}, Kenji Kaneko^{4 b b)}, Yuko Sasaki^{5 b)}, Toshiaki Tanaka^{6 b)},
Tsugikazu Tomono^{7 b)}, Takeo Tomomizu^{4 b)}, Shouichi Hayami^{5 b b)}, Minako Hijikata^{8 b b)},
Ichiro Hirako^{9 b b b)}, Makoto Mayumi^{10 b)}, Koichi Mikami^{11 b b b)}, Shunji Mishiro^{8 b b)},
Seiji Miyamoto^{12 b b)}, Kengo Muta^{12 b)}, Thomas Weimer^{13 b)}, Todd Gierman^{14 b)},
Katsutoshi Komuro^{1 b)} and Teruhide Yamaguchi^{15 b)}

¹Department of Blood and Safety Research, The National Institute of Infectious Diseases,
²Department of Bacteriology II, The National Institute of Infectious Diseases,
³Japanese Red Cross Saitama Blood Center, ⁴Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.,
⁵Benesis Corporation, ⁶Baxter Limited BioScience, ⁷Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center,
⁸Department of Medical Science, Toshiya General Hospital, ⁹Bayer Yakuhin Ltd.,
¹⁰Jichi Medical School, ¹¹Aventis Pharma Co. Ltd.,
¹²The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, ¹³Aventis Behring Ltd., ¹⁴Bayer Healthcare,
¹⁵Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science,