

^aSubcommittee on Safety for Plasma-Derived Products

(Chairman : Teruhide Yamaguchi, National Institute of Health Sciences)

^bWorking Group on the Establishment of National Standards for Nucleic Acid Technology Assay,

Present address ; ^cDepartment of Respiratory Diseases, Research Institute,

International Medical Center of Japan., ^dSchering-Plough K.K., ^eBayer Yakuin, Ltd.

The First WHO International Standard for HCV RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assay (96/790) was established in 1997. The aim of our collaborative study was the establishment of the Japanese National Standard for HCV RNA calibrated against the WHO International Standard. The candidate materials were evaluated in the following two steps. First, titers of two HCV positive plasma (119 and 122) diluted in cryosupernatant were evaluated, and plasma 122 was chosen as the source plasma for the candidate for the national standard. Then, candidate 122 was prepared by diluting the source plasma to approximately 10^5 international units (IU)/mI in cryosupernatant. The relative potency of the candidate was measured against the International Standard by the end-point method. Seven laboratories from three countries participated in the collaborative study. Four laboratories used the Roche Amplicor assay (Version 1) and 3 laboratories used in-house PCR methods. There was reasonable agreement among the mean estimates from the laboratories. The overall mean potency of the candidate relative to the International Standard was $10^{5.00}$ ($10^{4.80} \sim 10^{5.20}$) IU/mI. The sample was accepted as the first Japanese national standard and assigned a titer of 100,000 IU/mI. Each vial of the National Standard contains 0.5 mI of HCV plasma (genotype 1b) diluted in cryosupernatant and should be stored at - 80°C.

Key words : HCV, The WHO International Standard, National Standard, Nucleic acid technology (NAT) assay, Blood safety

1. はじめに

供血者の C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する抗体スクリーニングを実施したにもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤による HCV の感染が報告された。これは、HCV に感染してから抗体が検出されるまでのウィンドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた^{1,2)}。そこで、血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは 1999 年 7 月 1 日から原料血漿プールで HCV-RNA の核酸増幅検査 (NAT) を実施することになった。すでにイギリスをはじめオランダ、ドイツ、イタリア、アメリカ合衆国の各国では標準品やランコントロールを作製しており、NAT を実施する施設で使用されていたが、HCV-RNA 量がコピー数や genome equivalent 等まちまちの単位で表示されていたので、標準品の HCV-RNA 量や NAT 法の感度を相互に比較することが出来なかった。イギリスの NIBSC によって HCV-RNA

の国際標準品作製のための国際共同研究が組織され、1997 年 10 月に WHO 国際標準品 (96/790) が制定され、国際単位を用いて各国参照品の力価を比較することが可能になった^{3,4)}。わが国においては厚生省告示第 427 号によって、平成 13 年 3 月 1 日から製造され、又は輸入される血液製剤の原料血漿について B 型肝炎ウイルス DNA、C 型肝炎ウイルス RNA 及びヒト免疫不全ウイルス RNA に対する NAT を実施しなければならないことに改められた。実際にはそれ以前に日本赤十字社の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿プールについて HCV-RNA の NAT が実施された。しかし、施設ごとに NAT 法が異なり、自家標準品やキットの標準品の表示単位が統一されていなかったため、それぞれの施設での感度や精度を比較・評価することができなかった。国際単位で表示された広く認められた標準品を用いて感度や精度を測定することにより、施設間の比較や評価が可能になると考えられた。一方、国際標準品

はその配布数も限られており、国際標準品に対して較正された我が国独自の国内標準品の作製が望まれていた。そこで、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略）は HCV-RNA 量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、第一次 HCV-RNA 国内標準品を作製したので報告する。国際標準品は genotype 1 であるが、国内標準品は我が国で最も頻度の高い genotype 1b とした。現在、さまざまなウイルスについて臨床や研究の場で NAT が実施されているが、国内標準品として定められたものはまだない。その意味で、本標準品は我が国で初めて作製されたウイルスの NAT のための国内標準品でもある。

2. 材料および方法

1) 国内標準品候補の原料血漿の選択

日本赤十字社より供与された HBs 抗原、抗 HIV-1/2 抗体、HBV-DNA、HIV-RNA のすべてが陰性で、HCV 陽性の血漿の中から日本で最も高頻度に見られる genotype 1b の 2 つの血漿（119 と 122）を標準品の原料候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約 10^6 国際単位（IU）/ml に希釈して -80°C で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA 国際標準品とともに参加施設に配布した。各施設は測定ごとに新しいバイアルの候補品を脱クリオ血漿で希釈して 10 倍希釈系列（ 10^{-1} から 10^{-7} ）を調製することとし、日を替えて 2 回定性的な方法でエンドポイントの測定を実施した。一重測定を原則としたが、日常的に二重測定を実施している場合は二重測定した（第 1 回測定）。このとき使用した国際標準品は小分けして -80°C に凍結保存して第 2 回測定に用いた。

2) HCV-RNA 国内標準品候補の作製と評価

1) で選択した血漿 122（PHA 力価 2^{24} 、RNA 量 $2\sim 3\times 10^6$ IU/ml、容量 185ml）をあらためて約 10^6 IU/ml に脱クリオ血漿で希釈、0.5ml ずつガラス瓶に分注し -80°C で凍結して、HCV-RNA 国内参照品候補 122（候補品）とし、参加施設に送付した。各施設は初回は 10 倍希釈系列で予備的なエンドポイントを測定し、より正確なエンドポイントの値を得るために 2 回目以降はそのエンドポイン

トをはさんで 7 段階の $10^{0.5}$ 希釈系列を測定ごとに調製し、日を替えて 4 回測定を実施した（第 2 回測定）。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA 国内標準品候補の WHO 国際標準品に対する力価を推定した。

3) 参加施設と測定方法

日常的に HCV-NAT を実施している 9 施設（国内 6 施設、米国 2 施設、ヨーロッパ 1 施設）に候補品を配布し、7 施設（国内 5 施設、米国 1 施設、ヨーロッパ 1 施設）から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。

4) 測定値の分析

候補品、国際標準品についてそれぞれのエンドポイント濃度の対数値の平均を求め、その比を国際標準品に対する候補品の対数相対力価とする。施設ごとに国際標準品に対する候補品の対数相対力価とその 95% 信頼区間を推定した。7 施設から得られた対数相対力価の加重平均を求めて候補品の対数相対力価を推定した。対数相対力価の真数は国際標準品に対する候補品の相対力価を現すので、真数の値を国際標準品の力価に乗じて候補品の力価を推定した。

3. 結果

1) 参加施設が実施した測定方法

血漿分画製剤製造所 5 施設（国内 3 海外 2）、公的機関 1 施設、その他 1 施設の合計 7 施設から結果が返送された。Table 1 に参加施設を表すコード番号、抽出法、検出法を示す。4 施設がアンプリコア HCV（Ver. 1）変法、2 施設が自家法の nested PCR 法、1 施設が自家法の single PCR 法を用いて測定した。反応当たりの試料の量は $40\sim 400\mu\text{l}$ の血漿に相当した。

2) 原料血漿の選択

国内標準品は様々な NAT 法に使用されるので、候補品にふさわしい原料を選択する目的で、第一回測定では 2 つの HCV 陽性血漿 119 と 122 を希釈した試料を配布して測定した。大きな相違がなかったので、より多くの標準品の作製が可能のように容量の大きい血漿 122 を候補品の原料として選択した。血漿 122 の HCV コア領域の塩基

Table 1 Assays used in the collaborative study.

Laboratory	Assay	Extraction ^a	Eq. Vol. Amplified ^b
1	Amplicor	R&D	100
2	In-house single PCR	In-house Nal	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	Amplicor	R&D	100
5	Amplicor	QIAamp	400
6	In-house nested PCR	R&D	100
7	In-house nested PCR	R&D	100

a) R&D : Smi-test EX-R&D (Nippon Genetics Co. Ltd.)

Amplicor : Amplicor HCV version 1 (Roche)

QIAamp : QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

b) Eq. Vol. Amplified: the equivalent volume of sample that was amplified in an assay

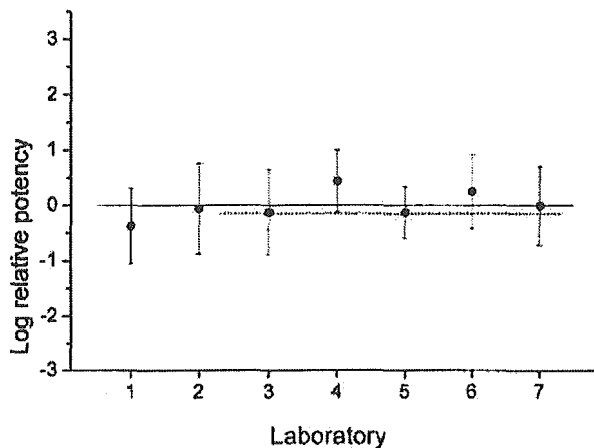


Fig. 1 Log relative potency of candidate 122 to the international standard (96/790) The laboratory code number and assay methods are explained in Table 1. The solid line indicates the mean log relative potency calculated from all data, -0.001 (-0.204 - $+0.201$) The dotted line indicates the mean log relative potency calculated from the data excluding those of the laboratories 1 and 2, $+0.066$ (-0.161 - $+0.292$).

配列を決定して genotype 1b であることを確認した。

3) 候補品 122 の国際標準品 (96/790) に対する力価の推定

あらためて候補品を送付し、7施設において $10^{0.5}$ 希釈系列で測定した(第2回測定)。5施設で独立の4回の測定、2施設で各2回繰り返し測定を独立に4回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する候補品の対数相対力価を求め

Table 2 Estimated log potency of candidate 122 calibrated against the international standard (96/790) Overall (a) = the overall mean log potency calculated from all laboratories. Overall (b) = the overall mean log potency calculated from data excluding those of laboratories 1 and 2.

Laboratory	log ₁₀ IU/ m/		
	Mean	Minimum	Maximum
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
Overall (a)	5.00	4.80	5.20
Overall (b)	5.07	4.84	5.29

た。なお、エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。また、不連続な陽性結果を含む場合は希釈率の高いほうをエンドポイントとした。施設毎に候補品の国際標準品に対する対数相対力価とその95%信頼区間を求め、全施設の測定結果を用いて候補品の国際標準品に対する対数相対力価を推定した。Fig. 1に示すように全施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{-0.001}$ であった。WHO国際標準品(96/790)の力価は 10^5 IU/m/ であるから、候補品の力価は $10^{5.00}$ ($10^{4.80-5.20}$) IU/m/、即ち 100,000 IU/m/

と推定された (Table 2)。

参加7施設中、施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった。また施設2では不連続な陽性結果が多く、測定結果のばらつきが大きかった。そこで、この2施設を除く5施設の測定結果を用いて分析した結果、5施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{0.66}$ であった (Fig. 1)。よって、候補品の力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.84-5.29}$) IU/ml、即ち 116,300 IU/ml と推定され、全施設の結果を用いた分析結果と有意な相違は認められなかった (Table 2)。最尤法で本研究の測定値を分析すると候補品の推定力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.86-5.30}$) IU/ml となり、2つの分析法による推定値はよく一致した。

以上の結果から、候補品 122 の国際標準品に対する力価は $10^{5.00}$ IU/ml と推定され、力価 100,000 IU/ml の国内標準品として 1999 年 12 月に小委員会承認された。

4. 考 察

一般に個々の施設で国際標準品に対する2次標準品を作製すると新たな誤差が生じるので、異なる2次標準品を用いて測定した結果を相互に比較するのは困難である。HCV-RNA NAT 試験において異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理を実施するためには性状が詳しく調べてある広く認められた共通の標準品が必須である。本共同研究によってわが国で初めて、国際単位表示された HCV-RNA の国内標準品が制定された。候補品の 95% 信頼区間は力価 $10^{5.00}$ IU/ml に対して $10^{4.80-5.20}$ IU/ml であった。また参加施設のなかの力価の最大は $10^{5.44}$ IU/ml (施設 4)、最小は $10^{4.63}$ IU/ml (施設 1) で $10^{0.81}$ 倍の相違であった (Table 2)。これらの値はエンドポイントの測定を $10^{0.5}$ 倍希釈系列で実施したことを考慮すると十分に小さいといえる。これは本共同研究の参加施設を日常的に HCV-NAT を実施している信頼性の高い施設に限ったためと考えられる。国内標準品は分与される予定であるので、血液製剤の安全性確保のための NAT 試験法や診断薬の評価、臨床

検査センターにおける HCV-RNA 検査の評価に広く用いられるようになれば、相互の性能を容易に比較することが可能になり、試験法・検査技術の向上が期待できる。各施設で国内標準品を用いて繰り返し測定することにより有効検出限界の推定値を得ることが可能である。こうして得られた有効検出限界をもとに、たとえば 95% 陽性反応を得られる濃度と 50% 陽性反応を得られる濃度の標準品を常に測定に加えた測定結果を集積し、継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ることが望まれる。

5. 結 論

血漿の HCV-RNA の NAT のための国内標準品を作製した。国内標準品は HCV 抗体陽性の HCV genotype 1b 陽性血漿を脱クリオ血漿で希釈し、0.5ml/ ずつバイアルに分注、 -80°C で凍結保存したもので、その力価は 100,000 IU/ml である。

謝辞：本研究で作製した国内標準品は国内献血血液から製造された。本共同研究は厚生労働省科学研究費補助金「医薬安全総合研究事業、血液製剤の安全性向上に必要な試験法評価法の開発と改良に関する研究」の助成により行われた。

文 献

- 1) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM, Nübling CM, Willkommen H, and Lower J: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet*, 345: 1173-1174, 1995.
- 2) Vrielink H, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang*, 68: 55-56, 1995.
- 3) Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang*, 76: 149-158, 1999.
- 4) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and The Collaborative Study Group: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. *Vox Sang*, 78: 217-224, 2000.

特 論

動物由来感染症としてのプリオン病

堀内基広

Prion diseases as infectious disease transmissible from animals to humans

Motohiro Horiuchi

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

Abstract

Prion diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE) have been recognized as zoonosis since the existence of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) was reported in 1996. After then, BSE became a serious social problem all over the world. The incidence of BSE in EU and UK appears declining, and the vCJD incidence also shows a tendency to decrease. On the contrary, fears for the spread of BSE became actual problems: BSE occurrence outside of EU, introduction of BSE to other ruminants, and transmission of vCJD by blood transfusion. To prevent further spread of animal prion diseases and to reduce their risk to human being, active surveillance for animal prion diseases, removal of specified risk materials from food and feed chains, and effective feed regulation for livestock should be important. For the disclosure and elimination of prion-contaminated blood, materials for medical and pharmaceutical products, it is required to improve the sensitivity of prion detection methods. Furthermore, establishment of the therapeutics for human prion diseases is urgent problem.

Key words: prion, BSE, CJD

はじめに

プリオン病は原因論から感染性、遺伝性、孤発性に分類される(表1)。動物のプリオン病は病原体(プリオン)が体外から侵入することが原因の感染性プリオン病である。ヒツジのスクレイピーとシカの慢性消耗病(CWD)は自然状態でそれぞれの宿主で感染が成立する。牛海綿状脳症(BSE)以下の動物プリオン病はプリオンに汚染された飼料の給餌が原因である。

ヒトのプリオン病のうち, kuru, 医原性 Creutzfeldt-Jakob 病 (iCJD), および BSE がヒトに伝播した変異 CJD は感染性プリオン病に分類される。家族性 CJD, Gerstmann-Sträussler 症候群, および致死性家族性不眠症の遺伝性プリオン病は PrP 遺伝子の変異が原因である。ヒトのプリオン病の約 80% を占める孤発性 CJD は, プリオンの感染および PrP 遺伝子の変異とは関連がなく, 孤発性プリオン病に分類される。

北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

0047-1852/05/¥40/頁/JCLS

表1 プリオン病の分類

動物のプリオン病	宿主, 発生動物
スクレイピー	ヒツジ, ヤギ
慢性消耗病 (chronic wasting disease: CWD)	シカ, エルク
牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy: BSE)	ウシ
伝達性ミンク脳症 (transmissible mink encephalopathy: TME)	ミンク
猫科動物の海綿状脳症 (feline spongiform encephalopathy: FSE)	家猫, ビューマ, チーター, オセロットなど
その他の反芻動物の海綿状脳症	クードゥー, エランド, ニアラ, オリックスなど

ヒトのプリオン病	原因
Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD)	
孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病 (sCJD)	孤発 (不明)
家族性 Creutzfeldt-Jakob 病 (fCJD)	遺 伝
医原性 Creutzfeldt-Jakob 病 (iCJD)	感 染
変異 Creutzfeldt-Jakob 病 (vCJD)	感 染
Gerstmann-Straüssler 症候群 (GSS)	遺 伝
家族性致死性不眠症 (FFI)	遺 伝
クールー	感 染

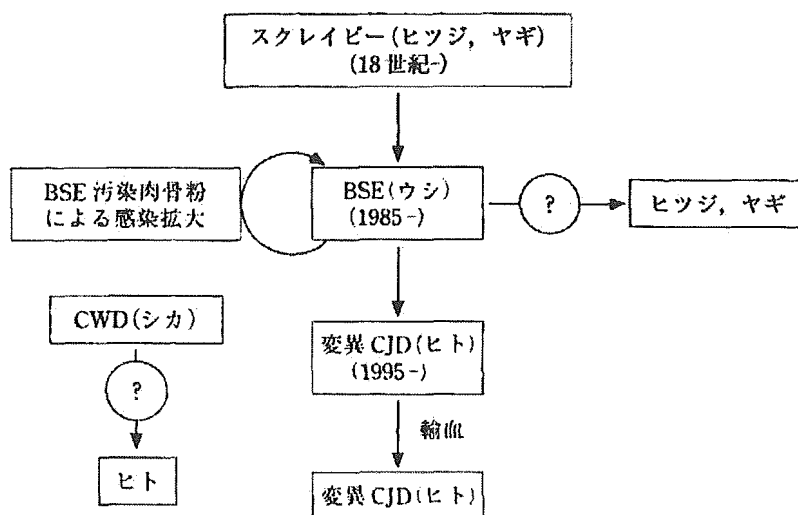


図1 動物プリオン病の感染の拡大

1. 感染の拡大

a. 動物種を越えた感染の拡大 (図1)

BSEの発生原因はヒツジスクレイピー病原体に汚染された肉骨粉の給餌と考えられている (ヒツジ起源説)。イギリスでは1920年頃から蛋白質源として肉骨粉を濃厚飼料や代用乳に添加して使用していたが、BSEの発生は1985年以降であるので、BSEの発生には何らかの要因

が関与している。この要因はレンダリング工程の簡略化であると推測されている。1980年以前は熱処理、それに続く有機溶媒による獣脂の抽出が行われていた。この一連の工程によりスクレイピー病原体は不活化されていたと考えられる。しかし、1980-83年にかけて有機溶媒抽出が行われなくなった。その結果、病原体が完全に不活化されずに肉骨粉中に残存したと考えられている。また、BSEの発生はウシの孤発性

表2 世界各国におけるBSE発生数

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
イギリス	4,393	3,235	2,301	1,443	1,202	1,144	612	343	121
ベルギー	1	6	3	9	46	38	15	11	1
チェコ	0	0	0	0	2	2	4	7	5
デンマーク	0	0	0	1	6	3	2	1	
フランス	6	18	31	161	274	239	137	54	
ドイツ	2	0	0	7	125	106	54	65	
アイルランド	80	83	91	149	246	333	183	126	47
イタリア	0	0	0	0	48	38	29	7	3
オランダ	2	2	2	2	20	24	19	6	
ポルトガル	30	127	159	149	110	86	133	92	28
スペイン	0	0	0	2	82	127	167	137	66
スイス	38	14	50	33	42	24	21	3	3
日本	0	0	0	0	3	2	4	5	6
イスラエル	0	0	0	0	0	1	0	0	0
カナダ	0	0	0	0	0	0	1	1	1
アメリカ	0	0	0	0	0	0	1	0	1

プリオン病に起因するという牛起源説も唱えられている。いずれにせよ、一度BSEが発生すると、BSE牛が肉骨粉の原料としてリサイクルされ、その結果BSEの発生が拡大したのである。

1990年に発見された家猫の猫海綿状脳症(FSE)の発生原因は、BSE病原体に汚染されたペットフードと考えられている。また、動物園で飼育されていたピューマなどの海綿状脳症も脊椎を含むウシの生肉の給餌が原因と考えられている。

b. ヒトへの感染拡大

BSE病原体が食肉などを介してヒトへ感染するという懸念は、1996年3月のvCJDの発生報告により現実のものとなった。更にBSE病原体とvCJD病原体が、生物学的大よび生化学的に非常に類似していることも明らかとなり¹²⁾、以降、BSEは人獣共通感染症と認識されるようになった。

ヒツジのスクレイピーは、18世紀半ばには病気の存在を示唆する記録があるが、これまでヒツジのスクレイピーとヒトのプリオン病の関連を積極的に示唆する疫学的な事実はない。しかし、スクレイピーがヒトに感染することを完全に否定することはできない。また、1990年代

末にアメリカで、シカのハンティングをする30歳前後の男性数人がCJDを発病したことから、北米で発生している鹿科動物のCWDがヒトに感染するかが問題となっている。BSEはヒトPrPを発現するマウスに伝達するが³⁾、CWDはヒトPrPを発現するマウスに伝達しないなど⁴⁾、現在までCWDがヒトに感染することを積極的に示す事実は得られていない。

2. 現在の発生状況

a. 世界のBSE発生状況

表2に各国における最近のBSE発生数を示した⁵⁾。英国では1992-3年をピークに発生は減少しているが、現在でも年間数百頭の発生がある。英国では1996年3月にvCJDの存在を発表すると同時に、動物由来の飼料をすべての動物に使用しないという完全な飼料規制を実施した。しかし、英国では2005年8月現在、1996年8月以降に生まれたウシ(BARBs)で109頭のBSE感染牛が摘発されている⁶⁾。この事実は、一度BSEで汚染されると清浄化には莫大な労力と時間がかかることを物語っている。

スイスでは他の欧州諸国よりも早くBSEの発生があったが、2000年以降減少傾向にある。

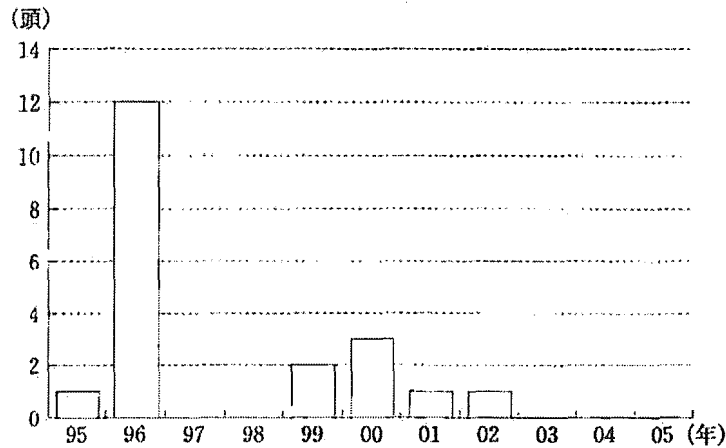


図2 我が国で摘発された BSE 感染牛の出生年の分布

他の欧州諸国では、2000年もしくは2001年以降、BSE感染牛の数が著しく増加している。この増加は能動的サーベイランスの導入により、BSE感染と診断されたウシの数が増加した結果である。例えば、2003年のフランスの137頭のBSE感染牛の内訳は、臨床症状からBSEが疑われたウシで13頭、死亡牛などの高リスクグループの能動的サーベイランスで87頭、と畜場でのスクリーニングで37頭である。この数字は、BSE汚染状況の正確な把握には、と畜場におけるスクリーニング、およびリスク牛の能動的サーベイランスが必要であることを示す格好の例である。欧州での発生も2003-4年頃から減少傾向に転じている。

一方、我が国やイスラエルでのBSEの発生、北米におけるBSEの発生が示すように、BSEの感染源は英国、欧州にとどまらず、世界各地に広がったと認識する必要がある。今後、国や地域のBSE汚染状況を明らかにするためには、能動的サーベイランスの実施が必要である。

b. 我が国での BSE 発生状況

図2に、我が国で摘発されたBSE感染牛の出生年を示した。これまでに20頭が摘発されているが、1996年生まれのウシで最も多い。英国におけるvCJDの発生を受けて、我が国では1996年に肉骨粉を牛の飼料に使用しない行政指導を行った。しかし、最近のBSEスクリーニング/サーベイランスでは1999年および2000年生まれのウシからBSE感染牛が計5頭摘発されて

いる。したがって、この時期にもBSE汚染源が存在していたことになる。BSEの潜伏期は平均4-8年であり、1999-2000年生まれのウシはこれから好発年齢に達する。また、1997-98年生まれのウシではBSE感染牛が確認されていないが、この時期の汚染状況を判定するには、もう少しスクリーニング/サーベイランス結果の蓄積を待つ必要がある。

c. vCJD の発生状況

表3に英国におけるヒトプリオン病の発生状況とvCJD患者が確認された国を示した⁷⁾。2005年8月までに英国では157人の患者が確認されているが、増加傾向は認められていない。英国以外ではフランスなどでvCJD患者が確認されている。2005年に、我が国でも、英国およびフランスに短期間滞在経験のある男性がvCJDに罹患していたことが判明した。

vCJDでは、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})が扁桃や盲腸の粘膜下リンパ濾胞などの末梢リンパ系組織に蓄積し、容易に検出できる^{8,9)}。一方、vCJD以外のヒトプリオン病の場合は、リンパ系組織からPrP^{Sc}は容易には検出されない。英国で盲腸摘出術あるいは扁桃除去術により摘出された盲腸あるいは扁桃を検索した結果、12,674検体中3検体がPrP^{Sc}陽性であった。この結果を英国の人口に外挿し、3,800人程度の人々がvCJDの潜伏期にある可能性を指摘する報告もある¹⁰⁾。

表3 イギリスのヒトプリオン病発生状況と、各国におけるvCJD発生状況

年	孤発性 CJD	変異 CJD	医原性 CJD	遺伝性 プリオン病	国	vCJD 患者数
95	35	3	4	5	フランス	13
96	40	10	4	6	アイルランド	2
97	60	10	6	5	イタリア	1
98	63	18	3	5	アメリカ	1
99	62	15	6	2	カナダ	1
00	50	28	1	3	オランダ	1
01	28	20	4	5	日本	1
02	72	17	0	5	スペイン	1
03	77	18	5	6	ポルトガル	1
04	49	9	2	4		
05	10	2(7)	0	1		

括弧内の数字は存命の患者数。

3. 新たな課題

a. 非定型BSE, 非定型スクレイピーの存在

野外に存在するヒツジスクレイピーには様々な“株”が存在することが知られている。一方、BSEは一つの株と考えられてきた。しかし、2003年にイタリアで、これまでのBSEとはPrP^{Sc}の脳内蓄積部位、生化学性状(糖鎖型、分子量)が明らかに異なるBSE発症牛が報告された¹¹⁾。時を同じくして、日本¹²⁾、フランス¹³⁾でもPrP^{Sc}の生化学性状が従来型と異なるBSE感染牛が報告された。

イタリアの非定型BSE症例は、PrP^{Sc}の生化学性状、脳内のPrP^{Sc}の分布など多くの情報が得られている。典型的なBSEではPrP^{Sc}の糖鎖型は二糖鎖型が優勢であるのに対して非定型例では一糖鎖型が優勢である。典型的なBSEはPrP^{Sc}の蓄積は延髄門部、視床下部、視床で認められる。延髄門部でPrP^{Sc}の蓄積量が多いのは、経口ルートで侵入したプリオンが、迷走神経を経て背側迷走神経核に到達することを反映している。一方、イタリアの非定型BSEでは、視床で蓄積が最も多く、次いで嗅球、海馬などで多い。非定型BSE症例が感染によるものと仮定すると、PrP^{Sc}分布の違いは、プリオンが中枢神経系組織へ到達する経路が典型的なBSEとは異なる可能性を示唆している。

ヒツジスクレイピーでも、従来知られている

スクレイピーとは病型が異なるものが発見されている。従来型のスクレイピーではPrP^{Sc}の蓄積は延髄門部で最も高い。一方、新たに発見されたスクレイピーでは門部におけるPrP^{Sc}の蓄積が低く、PrP^{Sc}の蛋白分解酵素抵抗性も弱い¹⁴⁾。ノルウェーで初めて発見され、その後、ドイツやフランスでも見つかっている¹⁵⁾。従来型のヒツジスクレイピーはPrP^{Sc}アミノ酸型171Q/Q(コドン171Q/Q)で多く発生し、171Q/Rで少なく、171R/Rを有するヒツジはスクレイピー抵抗性と考えられていた。しかし非定型ヒツジスクレイピーは171Q/Rのヒツジで発生が多く、171R/Rのヒツジでも感染が認められている¹⁵⁾。

b. BSE病原体に感染した可能性のある

ヤギの摘発

フランスでBSE病原体の性状と区別できないプリオンに感染したヤギが発見された¹⁶⁾。このヤギの中枢神経系組織に蓄積したPrP^{Sc}はBSE感染牛およびBSE実験感染ヤギのものと類似していたが、スクレイピー感染ヤギのものとは異なっていた。また、このヤギの材料をマウスへ伝達した場合の神経病変分布とマウスの脳で産生されたPrP^{Sc}も、BSE実験感染綿山羊の材料をマウスに伝達した場合と区別できなかった。BSE病原体が飼料などを介してヤギに感染したのか、あるいはこのようなプリオン野外株がヤギに存在していたのかを結論づけることはできない。しかし、BSE病原体様のプリオン

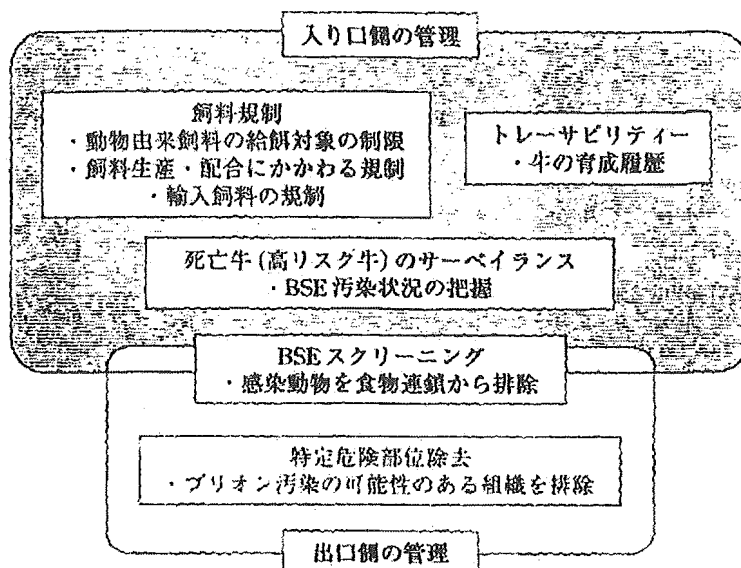


図3 我が国のBSE対策

が小反芻動物に存在したことから、小反芻動物由来の食肉などの安全性評価と管理措置を再検討する必要がある。

c. 輸血によるvCJDの伝播

これまでの動物実験における成績を総合すると、リンパ系装置にPrP^{Sc}が検出される場合は血液中にもプリオンが存在すると考えるのが妥当である。vCJDでは神経系以外にも、扁桃、盲腸の粘膜下リンパ濾胞などのリンパ系組織でもPrP^{Sc}が検出されることから、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。1例(PrPコドン129: M/M)は、献血の3年半後にvCJDを発症したヒト由来の赤血球を輸血された6年半後にvCJDを発症した¹⁷⁾。もう1例(PrPコドン129: M/V)は、献血の18カ月後にvCJDを発症したヒト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¹⁸⁾。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、これらの事例から、潜伏期にあるvCJD感染者の血液中に輸血により伝播し得る量のプリオンが存在することは事実である。

4. BSE対策

ヒトに感染することが判明している動物プリ

オン病はBSEのみであるので、本稿では、BSEが動物からヒトに感染することを防止するための対策について述べる。

a. 出口側の管理

我が国のBSE対策の柱は、①食用に供されるウシのBSEスクリーニング、②特定危険部位の除去、③リスク牛(死亡牛)のBSEサーベイランス、④飼料規制、⑤トレーサビリティである(図3)。このうちBSEスクリーニングと特定危険部位の除去は、BSE感染牛を流通から排除するための措置、言い換えると出口側の管理措置であり、ウシからヒトへの直接的な感染阻止に主眼が置かれている。

我が国の食肉検査で実施されているBSE検査はBSE感染牛の排除が目的であり、スクリーニングとして位置づけられている。どのような方法にも検出限界があることから、BSEスクリーニングでは検出限界以下のプリオンしか蓄積していないウシは陰性と判定される。一方、BSE感染牛の組織に分布するプリオンの99%が、脳、脊柱、眼球、三叉神経節、回腸遠位部の特定危険部位に存在すると推計されているので、特定危険部位の除去は、食肉の安全性を保証する有効な方法と考えられる。しかし、除去方法や除去効率に問題があること、また、病末期のウシでは末梢神経など特定危険部位以外の

組織にもプリオンが存在することから¹⁹⁾, 特定危険部位の除去だけでも不十分である。現在, 我が国では, BSEスクリーニングと特定危険部位の除去が双方の欠点を互いに補い, 高度に食肉の安全性を保証している。

この管理措置は, BSEが国内に侵入したことに対応するための緊急措置であり, その実行に莫大なお金と労力を使用している。食肉の安全性を効率的に保証するためには, 後述する入口側の管理, すなわち, BSEに感染していない動物を産生するための管理措置に力を注ぐ必要がある。

b. 入口側の管理

BSEは自然状態ではウシからウシへ感染する可能性が非常に低いことから, BSE汚染源の遮断を継続的に実施することで, BSEフリーのウシを飼育・生産することは可能である。このためには, リスク牛や綿山羊の能動的サーベイランスによる動物プリオン病の発生状況の把握, 徹底した飼料規制によるBSE汚染源の遮断, およびトレーサビリティ制度によるウシの育成履歴の記録, などの入口側の管理措置が重要となる。

BSE低汚染地域では, 臨床症状からBSEを疑うことは困難である。したがって, 汚染状況の正確な把握にはリスク牛の能動的サーベイランスの継続が必須である。前述したBSEスクリーニングは汚染状況の正確な把握にも大きく貢献している。今後, 最も重視しなければならない

いは飼料規制の遵守である。国内でのリサイクル, 飼料の配合, 飼肥料の輸入, 飼肥料の使用など, それぞれの現場で規制の遵守が強く求められる。BSEの根絶は飼料規制の有効性にかかっており, 関係各位のモラルが今後のBSEコントロールを左右することになる。

おわりに

PrP^{Sc}のオリゴマーが感染因子プリオンの本体であることが確定的となり, 難解な病原体の謎も徐々にひもとかれつつある²⁰⁾。しかし, プリオンおよびプリオン病を理解するためには, プリオン増殖の分子機構解明, 神経変性機序の解明など, 一層の基盤研究の進展が必要である。同時に, 食・医療などの安全性を確保するためには, 応用面の研究推進も必須である。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ことから, BSEスクリーニング/サーベイランス, 特定危険部位の除去を継続する必要がある。一方, BSE清浄地に復帰するために, 入口側の管理に力を注ぐ必要がある。BSEはウシからヒトへ感染が拡大し, 更に輸血によりヒトからヒト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。また, vCJDを含めて, ヒトプリオン病の治療法はないので, その開発も重要な課題である。

参考文献

- 1) Bruce ME, et al: Transmission to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501, 1997.
- 2) Collinge L, et al: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.
- 3) Asante EA, et al: BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J* 21: 6358-6366, 2002.
- 4) Kong Q, et al: Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci* 25: 7944-7949, 2005.
- 5) OIE: Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy(BSE) in farmed cattle worldwide. http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm
- 6) Defra: Confirmed cases of BSE in animals born after 1 August 1996(BARBS). <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/statistics/bse/barbs.htm>

異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達

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 〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

Biosynthesis and Transmission of Abnormal Prion Protein

Motohiro Horiuchi

Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University
Kita 18 Nishi 9, Kita-Ku, Sapporo 060-0818, Japan

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also called prion diseases, are fatal neurodegenerative diseases including scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy, and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. The causative agent of prion diseases, often called as prion, is composed mainly of pathogenic conformers (PrP^{Sc}) of a host protein called cellular prion protein (PrP^C). The direct interaction of two PrP isoforms including PrP^{Sc}-dependent conversion of PrP^C is thought to be a central event in pathogenesis of prion disease. Although the molecular mechanism of conversion is not yet fully understood, studies using neuronal cells persistently infected with prion have been disclosed many important aspects of the biosynthesis of PrP^{Sc}. For instance, the mature PrP^C expressed on the cell surface acts as a substrate for PrP^{Sc} formation, and a process that involves a conformational transformation takes place in subcellular compartments associated with the degradation pathway of PrP^C, including a sphingolipid-rich membrane microdomain, called a lipid raft and acidic compartments such as endosomes. Studies using in vitro conversion reactions have suggested that the conversion process is akin to autocatalytic polymerization and provided evidences on the binding domain being involved in the PrP^C-PrP^{Sc} interaction. Furthermore, in vitro conversion reaction using membrane-associated PrP^C and PrP^{Sc} revealed that insertion of PrP^{Sc} into the host membrane would be prerequisite to the induction of PrP^C conversion. More recently, it was reported that exosomes would be involved in the transmission of prion to recipient cells. These recent lucid findings provide a new insight into the biosynthesis and transmission of prion. However, there are still many things remains to be elucidated for complete understanding of the biosynthesis of PrP^{Sc} and the full identity of prion itself.

Key words : prion protein / conversion / lipid raft / multivesicular bodies

1. はじめに

人のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD), 羊のスクレイピーや牛のBSEに代表されるプリオン病は致死性神経変性疾患であり, 人での発生率はおおよそ100万人当たり1人である。プリオン病は発生原因から, 感染性, 遺伝性, および孤発性の三種に分類される (Table 1)。動物のプリオン病は全て感染性プリオン病に分類される。感染因子“プリオン”に汚染された成長ホルモン, 脳硬膜の使用による医原性CJD, BSEが食物連鎖により人に感染したと考えら

れている変異CJD, および, パプアニューギニアのフォア族で宗教的な食人儀式により伝播していたクールーは, 感染性プリオン病に分類される。家族性CJD, GSS, FFIはPrP遺伝子の変異が原因の遺伝性プリオン病である。人プリオン病の80~85%を占める孤発性CJDは, プリオンの感染およびPrP遺伝子の変異と関連がなく, 偶発的に正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) が異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) に変化することが病気の始まりと考えられる。感染性プリオン病ではPrP^{Sc}が外から宿主に侵入することが感染の第一段階である。感染性を有する蛋白質の増殖・

Table 1 Classification of Prion Diseases

動物のプリオン病	宿主、発生物
スクレイピー	羊、山羊
慢性消耗病(Chronic wasting disease, CWD)	鹿、エルク
牛海綿状脳症(Bovine spongiform encephalopathy, BSE)	牛
伝達性ミンク脳症(Transmissible mink encephalopathy, TME)	ミンク
猫科動物の海綿状脳症(Feline spongiform encephalopathy, FSE)	家猫、ピューマ、チーター、オセロップなど
その他の反芻動物の海綿状脳症	クードゥー、エランド、ニアラ、オリックスなど
人のプリオン病	原因
クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)	
孤発性 CJD	孤発 (不明)
家族性 CJD	遺伝
医原性 CJD	感染
変異 CJD	感染
ゲルストマン・ストライスラー症候群(GSS)	遺伝
家族性致死性不眠症(FFI)	遺伝
クールー	感染

Table 2 Possible role of PrP^C

リンパ球の活性化
シナプス伝達
神経細胞のシグナル伝達
概日周期の調節
抗酸化機構
Cu ²⁺ の代謝
神経細胞死
細胞内 Ca ²⁺ の恒常性

伝播機構は不明な点が多く残されているが、細胞膜系が関与することは明白である。本稿では、プリオンの増殖・伝播と膜系の関わりを示す最近の報告を含め、PrP^{Sc}の増殖、細胞間伝播機構について概説したい。

2. プリオン蛋白質 (PrP) とプリオン増殖の概念

PrPは宿主遺伝子PrPにコードされる。遺伝子産物PrP^Cはグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)により細胞膜に結合するGPI膜結合型糖蛋白質である。PrP^Cは多くの組織で発現しているが、特に中枢神経系組織で発現が高い。PrP^Cの生理機能に関して様々な報告があるが (Table 2), PrP欠損マウスは正常に発育・繁殖することから、生命維持に必

須な機能は担っていないと考えられる。

プリオン病に罹患した動物の脳組織にはPrP^{Sc}が蓄積する。PrP^{Sc}もPrP^Cと同様に宿主遺伝子PrPの産物であるので、アミノ酸配列はPrP^Cと同じである。しかし、PrP^CとPrP^{Sc}は高次構造が異なり、その結果PrP^{Sc}は凝集体を形成するために、蛋白質分解酵素抵抗性や不溶性という生化学性状を示す。蛋白質分解酵素抵抗性とPrP^{Sc}は同義ではなく、PrP^{Sc}の一性状に過ぎない。プリオン病に罹患した動物の組織に存在するPrP、あるいはプリオンの感染性を担うPrP分子を示す言葉としてPrP^{Sc}が使用されることが多い。

PrP^{Sc}は感染因子“プリオン”

の主要構成要素で、PrP^{Sc}オリゴマーが感染因子を形成すると考えられている。感染性プリオン病では、PrP^{Sc}オリゴマーが宿主に侵入することが感染であり、PrP^{Sc}オリゴマーが核 (seed) となって鋳型のよう働き、PrP^CをPrP^{Sc}に転換する。これが繰り返されてPrP^{Sc}オリゴマーが成長することが、プリオンの複製と見做すことができる (Fig. 1)。一方、孤発性および遺伝性プリオン病では“感染”とは無関係に、偶発的にPrP^{Sc}オリゴマーが形成されることが病気の始まりである。PrP^C (もしくは少なくとも一部がアンフォールドした遷移体PrP^U) とPrP^{Sc}オリゴマーは平衡状態にあるが、PrP^{Sc}のオリゴマーは不安定なので、PrP^{Sc}オリゴマーは容易には形成されない。しかし一度安定なPrP^{Sc}オリゴマーが形成されると、これが核となってPrP^CをPrP^{Sc}に転換してゆく (Fig. 1)。核形成以降のPrP^{Sc}増殖プロセスは感染性プリオン病と同じである。

3. 細胞におけるPrPの生合成

神経芽細胞にスクレイピー感染マウス脳乳剤を接種してクローニングを行うことで、スクレイピー持続感染細胞を得ることができる。PrP^CとPrP^{Sc}の生合成機構の解析には、こうして作出されたプリオン持続感染神経芽細胞を用いた細胞生物学的実験系が大きく貢献している (Fig. 2)。

PrP^Cは膜蛋白質であり、ER上で合成されたポリペ

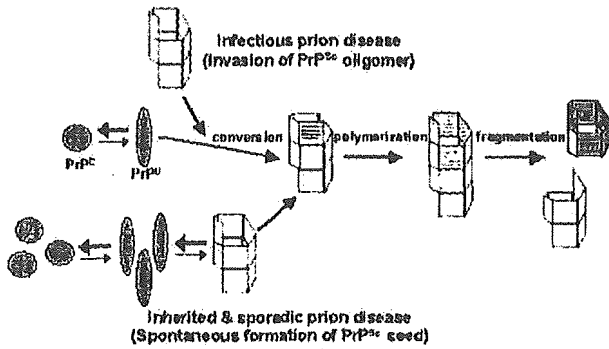


Fig. 1 Model for prion propagation. Invasion of exogenous PrP^{Sc} oligomer (infection) causes infectious prion disease. Incoming exogenous PrP^{Sc} binds PrP^C (or its unfolded intermediate, PrP^U) and then PrP^C is converted into new PrP^{Sc}. Incoming PrP^{Sc} acts as a seed for the conversion process. On the other hand, spontaneous formation of PrP^{Sc} seed from PrP^C or PrP^U initiates inherited and sporadic prion diseases. Once stable PrP^{Sc} seed is generated, the following conversion process is the same as that in the infectious prion disease.

ブチド鎖はすぐにER内腔に移行する。このときN末端のシグナル配列は除去される。ERでC末端の22-23アミノ酸の除去とGPIアンカー付加、分子内SS結合の形成、高マンノース型糖鎖の付加が起こる。一部のPrP^C、おそらく正しく折りたたまれなかったPrP^CはERを通過できずにER付随ユビキチンプロテアソーム系で分解される。ゴルジ装置を経る過程で複合糖鎖へと修飾され成熟型PrP^CはGPIアンカー型膜蛋白として細胞表面に発現する。PrP^Cは速やかに合成されるが半減期も短い (Table 3)。細胞膜上に発現した成熟型PrP^Cはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。クラスリン被覆小胞を介する経路と非クラスリン被覆小胞を介する経路があると考えられている²⁻⁴。細胞内に取り込まれたPrP^CはN末端のトリミングが起こり、111番目のアミノ酸近傍で切断され、PrP^C末端側の領域を含む約18 kDaのポリペプチドが生じる⁵。この切断はスフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜ドメイン (ラフトあるいはカベオラ) で起こり³、切断にはメタロプロテアーゼが関与するとの報告もある^{6,7}。この分解中間産物はエンドソームと考えられる酸性コンパートメントで分解される⁸⁻¹⁰。細胞内に取り込まれたPrP^Cの一部は再び細胞膜にリサイクルされる⁸。

PrP^Cに比べPrP^{Sc}の生合成と分解は非常に遅い (Table 3)。PIPLC処理により細胞表面に発現するPrP^Cを除去すると、プリオン持続感染細胞における

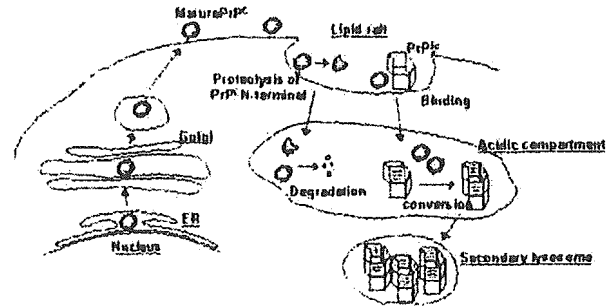


Fig. 2 Biosynthesis of prion protein in the cells. PrP^C matures during the secretory pathway and expressed on the cell surface as GPI-anchoring protein. In the lipid raft and/or acidic compartments such as endosome, N-terminal part of PrP^C was partially proteolysed, and then degraded. Initial interaction between PrP^C and PrP^{Sc} is believed to take place in lipid raft, and the conversion of PrP^C to PrP^{Sc} occurs along a degradation pathway, possibly in lipid raft and/or acidic compartments. PrP^{Sc} is accumulated in the secondary lysosome.

PrP^{Sc}の産生が阻害されることから、細胞膜上に発現した成熟型PrP^CがPrP^{Sc}生成の基質となること、およびその生成は細胞膜を含めエンドサイトーシスの過程で起こることが示された^{9,10}。ロバスタチン処理により細胞膜をコレステロール飢餓状態にするとPrP^{Sc}の産生が阻害される³。PrP^{Sc}は主に二次リソソームに蓄積すると考えられているが^{11,12}、ラフトにもPrP^{Sc}が存在することから、PrP^CとPrP^{Sc}の会合などのPrP^{Sc}形成の初期段階は細胞膜上のマイクロドメインであるラフトで起こることが示唆されている^{13,14}。一方、エンドソームやリソソームに作用する薬剤の幾つかでPrP^{Sc}生成阻害効果が認められることから¹⁵、PrP^{Sc}への転換はエンドソームのような酸性コンパートメントでも起こると考えられる。PrP^{Sc}の半減期は非常に長い、硫酸多糖処理¹⁶や抗PrP抗体でプリオン感染細胞を処理した場合^{17,18}、3日程度の処理でPrP^{Sc}は消失する。これらの処理はPrP^Cの正常な代謝経路に影響してPrP^{Sc}生成の基質であるPrP^CがPrP^{Sc}に供給されるのを阻害すると考えられる¹⁹。つまり、基質であるPrP^Cの供給を遮断するとPrP^{Sc}は増殖できず細胞内で分解される。

4. 無細胞実験系における蛋白質分解酵素抵抗性PrP分子 (PrP-res) の形成

スクレイビー感染動物脳から精製したPrP^{Sc}と³⁵S標識PrP^Cを特定条件下で反応させると、³⁵S標識PrP^Cがproteinase K (PK) 抵抗性の³⁵S]PrP-resに変

Table 3 Characteristics of PrP^C and PrP^{Sc}

	PrP ^C	PrP ^{Sc}
凝集性	-	+
非イオン系界面活性剤に対する溶解性	易溶性	難溶性
蛋白質分解酵素感受性	感受性	抵抗性
細胞内局在	細胞膜表面	二次リソソーム
合成時間	<30分	6-15時間
半減期	5時間	>24時間
二次構造	αヘリックス: 43% βシート: 3%	αヘリックス: 30% βシート: 45%

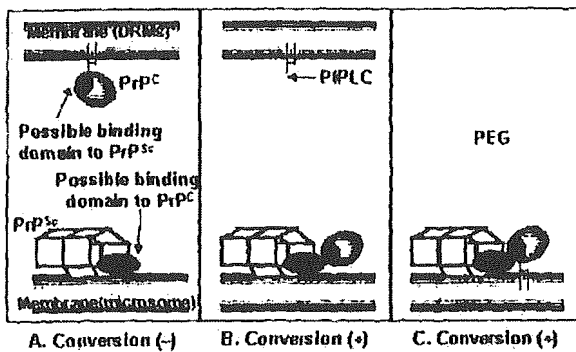


Fig. 3 Conversion of membrane associated PrP^C (an epitome of Baron et al., 2002²⁶⁾).

A. No conversion occurred when PrP^C (in DRMs) and PrP^{Sc} (in microsome) were inserted into the separate membranes. B. PrP^C could be converted if PrP^C was released from DRMs by PIPCL treatment. C. Conversion took place if PrP^C and PrP^{Sc} were inserted into the same membrane surface by PEG-induced fusion between DRMs and microsome.

換する²⁰⁾。この反応系 (in vitro conversion) で産生された [³⁵S]PrP-res は脳内に存在する PrP^{Sc} と同様の生化学性状を示すが、感染性が付随しないことから、PrP^{Sc} と厳密に区別する意味で PrP-res と表記する。PrP-res への転換は seed となる PrP^{Sc} に依存しており、seed となる PrP^{Sc} の変性に伴い転換活性は消失する²¹⁾。プリオン伝達の種の壁を再現できること^{22, 23)}、株特異的な PrP^{Sc} の生化学性状も再現できることなどから²⁴⁾、ある程度 in vivo で起きている PrP^C → PrP^{Sc} の転換機構を再現可能な試験系である。この反応系で、PrP^{Sc} と PrP^C の結合の特異性・選択性が証明できたことから、PrP^C と PrP^{Sc} の特異的な結合が PrP^C から PrP^{Sc} への構造転換への第一段階であること、PrP^C が PrP^{Sc} のレセプターに成りうることが示唆された²⁵⁾。

in vitro conversion は可溶性の PrP^C と精製 PrP^{Sc} を使用しているが、細胞レベルあるいは神経組織を考

えた場合、PrP^C → PrP^{Sc} への転換反応は膜分画で起こると考えられることから、より生理的な条件に近い実験系を構築する必要があった。Baron らは、³⁵S-メチオニンでメタボリックラベルした細胞から調製した Triton-X 不溶性画分 (detergent-resistant membranes, DRMs) をラフトに存在する PrP^C の供給源に、スクレイピ

ー感染マウスから調製したミクロソーム画分を細胞膜に付随した PrP^{Sc} の供給源として、in vitro conversion を行った^{26, 27)}。その結果、膜に付随する PrP^C と PrP^{Sc} 同士を混合しただけでは PrP^C の転換は起こらず、PrP^C を膜から遊離させると転換反応が起こった。さらに興味深いことに、膜に付随した PrP^C と PrP^{Sc} を混和し、ポリエチレングリコールで DRMs とミクロソーム画分を融合させると、PrP^C が PrP-res に転換した (Fig. 3)。PrP^C の C 末端側で構成されるドメインが PrP^{Sc} との結合に関与することが抗体による結合阻害試験から示されているが、細胞膜に結合した PrP^C の C 末端側は細胞膜による立体障害のために、異なる膜上にある PrP^{Sc} と結合できない可能性がある。しかし同一膜上に PrP^C と PrP^{Sc} が存在することで、PrP^C と PrP^{Sc} の会合が可能となり、その後 PrP^C が PrP-res へと構造転換するのかもしれない。この結果は、in vivo では単純に PrP^C と PrP^{Sc} が特異的に結合することが転換反応の第一段階でなく、両者を有する膜同士の融合が第一段階であることを示唆するとともに、細胞間での PrP^{Sc} の伝播を考える上で重要な知見である。

5. プリオンの細胞間の伝播

プリオンの体内侵入から神経組織への到達を考えた場合、プリオンは少なくとも数回、細胞から細胞へ移る必要がある。羊のスクレイピーの場合、自然状態では経口ルートで感染が成立する。経口ルートで取り込まれたプリオンは、パイエル氏板などの消化管附随リンパ装置 (GALT) から体内に侵入して GALT の濾胞樹状細胞で増殖した後、末梢神経から内臓神経を経て脊髄腰部に到達する経路、および末梢神経から迷走神経を経て延髄に到達する経路で、中枢神経系組織へ到達する²⁸⁾。末梢神経から中枢神経系組織へ侵入する際は、一度シナプス間隙を通過しなければならない。PrP^{Sc} はどのようにしてシナプス間隙を通過して次の神経細胞へ移るのであろうか？

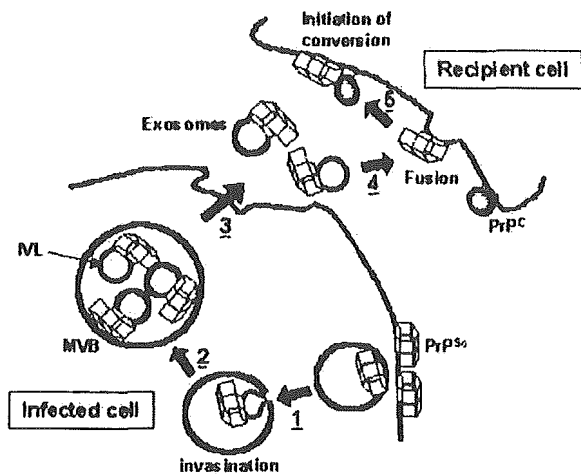


Fig. 4 Possible mechanisms of transmission of PrP^{Sc} from infected cell to uninfected cell (an epitome of Baron *et al.*, 2002²⁶⁾; Fevrier *et al.*, 2004³⁰⁾, 2005³⁴⁾). PrP^{Sc} transits to endocytic compartments and invagination of endosome membrane forms IVLs bearing PrP^{Sc} (1) during MVBs formation (2). IVLs bearing PrP^{Sc} are secreted into extracellular milieu as exosomes (3). The exosomes would be fused to the membrane of recipient cells (4) and the fusion would allow the interaction between PrP^C and PrP^{Sc} on the membrane of recipient cell (5).

レシピエントとドナーの細胞を共培養によりプリオンが効率良く伝達すること²⁹⁾、精製 PrP^{Sc} よりも PrP^{Sc} を含むマイクロソーム分画が、細胞への感染効率が高いことなどが知られている。前述した Baron らの成績でも、PrP^{Sc} と PrP^C が同一膜上にあると PrP^C の構造転換が起こることから、膜小胞が PrP^{Sc} の細胞間伝達に関与することが予想されていた。

最近 Raposo らは、プリオン持続感染細胞から放出された exosomes に PrP^{Sc} が存在し、実際にプリオンを非感染細胞に伝達できることを示した³⁰⁾。小胞を含むエンドソーム (multivesicular endosomes) は MVBs (multivesicular bodies, 多胞体)、多胞体内腔の小胞は IVLs (intraluminal vesicles) と呼ばれる。MVBs は細胞膜から取り込まれた膜蛋白質やトランスゴルジからソートされた膜蛋白質を含み、ライソソームと融合して、MVBs 中の蛋白質は分解される。しかし全ての MVBs がライソソームと融合するのではなく、網状赤血球では IVLs が細胞外に放出される^{31, 32)}。細胞外に放出される IVLs を exosomes と呼ぶ。網状赤血球にはライソソームがないことから exosomes が老廃蛋白質の処理を行うと考えられていた³²⁾。しかし、造血系細胞では exosomes が様々な機能分子を含んでおり、免疫系の調節に関連することが示唆されている。例えば exosomes が MHC クラス

II-ペプチド複合体を樹状細胞間で伝達する³³⁾。このように exosomes が膜小胞による細胞間のコミュニケーションに関与することが明らかになりつつある。

IVLs はエンドソーム膜が内腔に陥入してできるので、膜蛋白質の細胞外ドメインは IVLs の外側に、内腔は細胞質という構造となる。IVLs 表面に附随した PrP^{Sc} が exosome として細胞外に放出され、レシピエントとなる細胞に融合した場合、PrP^{Sc} とレシピエント細胞上の PrP^C が同一の膜表面に位置することになる。Baron らの成績と合わせて、PrP^{Sc} の細胞間伝達に exosomes による細胞膜の伝達に関与する興味深いモデルを提供すると考えられる (Fig. 4)³⁴⁾。

6. おわりに

プリオン仮説が登場してから20年以上が経過した。ウイルス、細菌などの病原体は“一個の病原体”を電子顕微鏡で見ることが可能であるが、依然として“一個のプリオン”の形態は不明である。PrP^{Sc} が主要な病原体構成と考えられるが、未だ最終的な結論は得られていない。一個のプリオン粒子の構造を明らかにすることは、プリオンの謎を解く重要な鍵である。不可解な点が多い病原体ではあるが、PrP^{Sc} と感染価を指標にした実験結果から、本稿で紹介したように、プリオンの増殖に関して多くの知見が得られてきた。また、本稿では最近の総説を紹介するに留めるが、PrP^C の生合成や細胞内輸送に関しても細胞生物学の進展により多くの知見が集積している³⁵⁾。しかし、プリオン増殖の分子機構を紐解くにはほど遠い。ウイルスが細胞内で増殖する際に、宿主細胞の微小環境と因子を利用するのと同じく、プリオンの増殖にも宿主細胞の微小環境と因子が関与する。このような微小環境と因子を明らかにしていくことで、プリオン増殖の分子機構が構築できるだろう。

基礎生物学的にはプリオン増殖の分子機構の解明は一つのゴールである。一方、病気に目を向けると、プリオン病は稀な病気ではあるが、一度発症すると進行性に死に至る致死的な病気であるが、未だ有効な治療法はない。プリオン増殖の分子機構の理解により、プリオン病治療の標的が見えてくると思われる。PrP^{Sc} 増殖を阻害する物質はプリオン病治療薬の候補となる。これまでに、プリオン持続感染細胞や *in vitro* conversion を利用して、硫酸デキストランや硫酸ペントサンなどの硫酸多糖体、ポルフィリン誘導体、キナクリンなどのアクリジン誘導体、クロロプロマジンなどのフェノチアジン誘導体、分枝ポリアミン、変異 PrP、抗 PrP 抗体など、PrP^{Sc} 増殖抑制活性を有する物質が数多く同定されている。幾つか

については, *in vivo*でも PrP^{Sc}の増殖を抑制することが報告されている. 今後, プリオン病治療候補薬の作用機序の解明, プリオン増殖機構の解明が進み, より効果的な治療薬や治療法の開発へつながることを期待したい.

文 献

- 1) Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A : *EMBO J.*, 20 5383-5391 (2001)
- 2) Shyng SL, Heuser JE, Harris DA : *J. Cell. Biol.*, 125 1239-1250 (1994)
- 3) Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avraham D, Laszlo L, Prusiner SB : *J. Cell. Biol.*, 129 121-132 (1995)
- 4) Peters PJ, Mironov A Jr, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB : *J. Cell. Biol.*, 162 703-717 (2003)
- 5) Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Auttilio-Gambetti L : *J. Biol. Chem.*, 270 19173-19180 (1995)
- 6) Jimenez-Huete A, Lievens PMJ, Vidal R, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Frangione B, Prelli F : *Am. J. Pathol.*, 153 1561-1572 (1998)
- 7) Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, Grassi J, Lopez-Perez E, Checler F : *J. Biol. Chem.*, 276 37743-37746 (2001)
- 8) Shyng SL, Huber MT, Harris DA : *J. Biol. Chem.*, 268 15922-15928 (1993)
- 9) Caughey B, Raymond GJ : *J. Biol. Chem.* 266 18217-18223 (1991)
- 10) Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB : *J. Biol. Chem.*, 267 16188-16199 (1992)
- 11) McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N : *Lab. Invest.*, 65 622-630 (1991)
- 12) Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, Farquhar C, McConnell I, Brown J, Hope J, Mayer RJ : *J. Pathol.*, 166 333-341 (1992)
- 13) Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RGW, Taraboulos A, Prusiner SB : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 14945-14949 (1996)
- 14) Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A : *J. Biol. Chem.*, 272 6324-6331 (1997)
- 15) Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B : *J. Virol.*, 74 4894-4897 (2000)
- 16) Caughey B, Raymond GJ : *J. Virol.*, 67 643-650 (1993)
- 17) Enari M, Flechsig E, Weissmann C : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 9295-9299 (2001)
- 18) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB : *Nature*, 412 739-743 (2001)
- 19) Kim CL, Karino A, Ishiguro N, Shinagawa M, Sato M,

- Horiuchi M : *J. Gen. Virol.*, 85 3473-3482 (2004)
- 20) Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B : *Nature*, 370 471-474 (1994)
- 21) Caughey B, Raymond GJ, Kocisko DA, Lansbury PT Jr : *J. Virol.* 71 4107-4110 (1997)
- 22) Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT Jr, Caughey B : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 3923-3927 (1995)
- 23) Horiuchi M, Priola SA, Chabry J, Caughey B : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 5836-5841 (2000)
- 24) Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B : *Nature*, 375 698-700 (1995)
- 25) Horiuchi M, Caughey B : *EMBO J.*, 18 3193-3203 (1999)
- 26) Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B : *EMBO J.* 21 1031-1040 (2002)
- 27) Baron GS, Caughey B : *J. Biol. Chem.*, 278 14883-14892 (2003)
- 28) van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA : *Arch. Virol. Suppl.*, 16 57-71 (2000)
- 29) Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR, Bostock CJ, Brockes JP : *Curr. Biol.*, 12 523-530 (2002)
- 30) Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 9683-9688 (2004)
- 31) Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM : *J. Cell. Biol.*, 101 942-948 (1985)
- 32) de Gassart A, Geminard C, Hoekstra D, Vidal M : *Traffic*, 5 896-903 (2004)
- 33) Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S : *Nat. Immunol.* 3 1156-1162 (2002)
- 34) Fevrier B, Vilette D, Laude H, Raposo G : *Traffic*, 6 10-17 (2005)
- 35) Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR : *J. Neurochem.*, 88 769-781 (2003)

(Received 21 January 2005;

Accepted 27 January 2005)

著者略歴

堀内 基広 (ほりうち もとひろ)

1986年 北海道大学獣医学部卒業

1988年 北海道大学大学院獣医学研究

科修士課程修了

同年 日本ロシユ株式会社

1989年 帯広畜産大学助手



1995年 同大助教授

1997～1999年 米国国立衛生研究所ロッキー山研究所訪問
研究員

2004年 北海道大学大学院獣医学研究科教授

現在に至る