

## 2. 学会発表

- 1) 古岡秀文、藪添敦史、田村勇耕、堀内基広、佐多徹太郎：動物プリオン病の病態形成に關与するサイトカインの探索. 第 142 回日本獣医学会（山口）2006.9.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

## 9. プリオン感染に対する宿主応答と体内伝播

分担研究者 石黒 直隆 岐阜大学応用生物科学部 獣医学課程 教授

研究要旨 動物プリオン病は、経口的に取り込んだ異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) が免疫系の細胞にて一旦増幅後、神経系に侵入して発症すると考えられている。本研究はプリオン感染の宿主応答において宿主が外来異物を最初に取り込み処理すると考えられるリンパ系細胞に焦点をあて、PrP<sup>Sc</sup> の取り込み能、分解能、蓄積能について、ウシとマウスの系を用いて検討した。本年度はウシの末梢血中の単球系細胞の分解能とマウスの培養細胞および骨髄由来マクロファージ (M $\phi$ ) 系細胞について検討した。ウシ末梢血由来の単球系細胞 (MHC-I, MHC-II, CD14, CD11b, CD11c) は、マウススクレイピー感染脳乳剤や BSE 感染脳乳剤を添加後、約 3 日目位から PrP<sup>Sc</sup> の分解が顕著となり、10 日目ではウエスタンブロット (WB) で検出できなくなった。マウス培養株マクロファージや骨髄から誘導した M $\phi$  では添加後 2 日目から顕著な分解が観察された。マウス骨髄由来樹状細胞でも添加後 2 日目ごろより顕著な分解が観察された。M $\phi$  系細胞での PrP<sup>Sc</sup> の分解は LPS 添加により促進された。また、非定型 BSE の発症機序の解明の一端として、ウシの年齢による PrP<sup>C</sup> 分子の発現量の変化を延髄門部を中心に WB で解析した。その結果、PrP<sup>C</sup> 発現量は高齢牛で若齢牛に比べて固体差が大きく可溶性画分が減少していた。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) に汚染した肉骨粉の摂取により感染し発症するとされている。ただし、経口摂取で BSE が発症するまでには一般に 3 年~5 年の時間が必要であり、自然感染例ではいつ PrP<sup>Sc</sup> を取り込み、いつ PrP<sup>Sc</sup> が増幅して神経に到達したかをトレースすることは極めて困難である。また、取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> がそのまま神経系に移行するかどうか不明である。また、同じ飼料を給餌されていた牛群でも発症する個体と発症しない個体が存在し、発症する個体の方がはるかに少ないのが現状である。つまり、給餌されても個体により PrP<sup>Sc</sup> を取り込まないか？ 摂取後生体内で PrP<sup>Sc</sup> が分解されるか？ あるいは生体の局所細胞内には存在するが神経系へ移行しないか？ 等、BSE プリオンの生体内での挙動に関しては不明な点が多い。

これまでのマウスを用いたプリオン感染実験で、取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> はマウスの濾胞樹状細胞 (FDC) にて一旦増幅し、その後、神経系に移行することが明らかとなった。つまり、マウスにおいては FDC や FDC ネットワークが

PrP<sup>Sc</sup> の増幅の場であり、神経系へ橋渡しをする細胞群であることが示された。また、B 細胞を欠損させたマウスでは FDC が成熟しないことからプリオンの複製やプリオン病の発病もないことが証明されている。しかし、ウシやヒツジの反すう獣での PrP<sup>Sc</sup> の増幅細胞群に関しては未だ不明である。また、ウシとヒツジに BSE プリオンを感染させた場合、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積する部位などに大きな差異があり、反すう獣の中にも種により BSE プリオンに対する応答差が存在するのも事実である。

本課題では牛の腸管での PrP<sup>Sc</sup> に対する宿主の初期応答を細胞レベルで明らかにする目的で、腸管リンパ組織で中心的役割を果たすと考えられるマクロファージ (M $\phi$ )、樹状細胞、FDC について検討した。本年度は、ウシの培養系の M $\phi$  に加えて末梢血由来の単球系細胞での PrP<sup>Sc</sup> の分解性について検討した。また、マウスの系では骨髄から誘導した M $\phi$  と樹状細胞 (DC) での PrP<sup>Sc</sup> の分解性についても検討した。さらに、非定型 BSE の発症機構の一端を解明する目的で若齢牛と高齢牛での PrP<sup>C</sup> 分子の発現量についても検討した。

## B. 研究方法

### 1) 牛 Mφ 株 Bo120 と培養法

昨年度と同様に牛 Mφ Bo120 株を実験に用いた。Bo120 の培養は 10%FCS 加 DMEM にて可能であり、トリプシンにて培養細胞をはがし、DMEM にて洗浄後、2 倍希釈にて細胞を継代培養した。

### 2) 牛末梢血由来の単球系細胞群

健康なホルスタインの末梢血からバフィコート分画を採取後、Ficoll-Conray 法にて単球系細胞群を分離し、2 時間シャーレにて静置培養し、シャーレに付着した細胞を単球系細胞群として感染実験等に用いた。

### 3) マウス培養 Mφ とマウス骨髄から誘導した Mφ や DC 細胞

マウス培養 Mφ として RAW264.7 と J774 を本試験に用いた。両細胞とも MHC-II と CD68 は陽性であり、PrP<sup>C</sup> の発現も陽性である。

マウス脛骨より骨髄を分離後、Mφ の誘導には L929 細胞上清を、DC 細胞の誘導には J558 培養上清を用いた。培養液には 10%FCS 加 DMEM を用いて必要に応じて各種培養上清液を添加して培養した。

### 4) 細胞の貪食能と細胞表面抗原の解析

培養細胞の貪食能は、FITC で標識した 1μm ラテックス粒子の取り込み能で評価し、直接蛍光抗体法で検査した。各種培養細胞の表面抗原は、抗牛 MHC-I 抗体、抗牛 MHC-II 抗体、抗牛 CD14 抗体、抗牛 CD21 抗体、抗牛 CD21 抗体、抗牛 CD11b 抗体、抗 CD11c 抗体を用いて FACS にて解析を行った。培養細胞での PrP<sup>C</sup> の発現解析には 6H4 抗体を用いて FACS 解析した。

### 5) 間接蛍光抗体法による PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> の解析

各種培養細胞での細胞表面上の PrP<sup>C</sup> の発現は mAb31C6 と mAb44b1 抗体を用いて間接蛍光抗体法 (IFA) で検査した。二次抗体は Alexa488 標識の抗マウス Fab 抗体を用いた。1%脳乳剤添加後の各種培養細胞での PrP<sup>Sc</sup> の取り込み能の検査は、培養細胞に 1%脳乳剤を添加し、24 時間培養後、浮遊している脳乳剤を取り除いた後に 2 種の抗プリオン抗体 (44B1 と 31C6) で IFA を行った。

### 6) ウェスタンブロット (WB) 解析による各種

培養細胞での PrP<sup>Sc</sup> の取り込みと分解性の解析

WB 解析は常法に従って行った。使用した抗プリオン抗体は、mAb44B1 と mAb31C6 であり、抗マウス α-tubulin 抗体は、コントロールの α-tubulin の検出に用いた。細胞による PrP<sup>Sc</sup> の取り込みと分解能の検査は以下の 2 方法を用いた。

- 代謝法：培養細胞 (6cm シャーレ、1 ~ 1.5 X 10<sup>5</sup>) に 1%マウススクレイピー帯広株あるいは 1%牛 BSE 脳乳剤を 50μl 添加し、培養して経時的 (時間と日数) に培養上清と細胞を回収し、プロテナーゼ K (PK) 処理後、残存している PrP<sup>Sc</sup> 量を WB で解析した。
- 吸着法：培養細胞 (6cm シャーレ、1 ~ 2 X 10<sup>5</sup>) に 1%脳乳剤 (マウススクレイピー株と BSE 株) を添加し、2 時間吸着培養後、上清を除去して DMEM にて一度洗浄し、培養液を加えて培養した。経時的にシャーレから培養細胞を回収し PK 処理後、PrP<sup>Sc</sup> の残存量を WB 法にて解析した。

LPS 添加による細胞の活性化後の PrP<sup>Sc</sup> の分解能への影響も検討した

### 7) 牛の年齢による延髄門部の PrP<sup>C</sup> の発現量

非定型 BSE の発症機序解明の一端として牛の年齢における PrP<sup>C</sup> の発現量の挙動に関して検討した。年齢を比較する目的で、22 ヶ齢と 148 ~ 229 ヶ齢の牛の延髄門部での PrP<sup>C</sup> の発現量を Yuan J (J.B.C. Sep.20, 2006) の方法に従って脳乳剤を調整し、WB にて可溶性画分 (S2) の PrP<sup>C</sup> と沈殿画分 (P2) の PrP<sup>C</sup> に分けて分析した。(倫理面への配慮)

マウスへのスクレイピー株の接種と採材は岐阜大学応用生物科学部の実験動物委員会の許可の基に行っており、マウスの飼育は P3 レベルの施設にて行っている。したがって倫理上問題は無い。

## C. 研究結果

### 1) 牛末梢血由来単球系細胞群の性状解析

牛末梢血より分離した単球細胞群の FACS 解析結果は、MHC-I, MHC-II, CD14, CD11b, CD11c が陽性であり、CD21 は陰性であった。また、抗 6H4 抗体に対して単球系細胞群の多くは陽性であり、ラテックス粒子の取り込みも旺盛であった。これらの結果は、シャーレに付着した細胞群の多くは単球系の細胞であることを示している。

2) 牛 MφBo120 と単球系細胞群の PrP<sup>Sc</sup> 分解性  
 牛 Mφ Bo120 とウシの末梢血から分離した単球系細胞群での PrP<sup>Sc</sup> 分解性を検討した。図 1 に Bo120 でのマウススクレイピー脳乳剤添加後の分解性を IFA で示した。添加 3 日目以降、顕著な現象が IFA でも確認された。WB 解析においても 3 日目ごろより PrP<sup>Sc</sup> の分解が確認された。

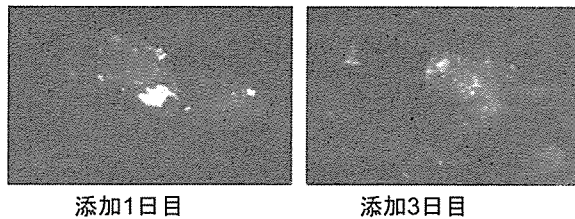


図1 牛MφBo120 での PrP<sup>Sc</sup> の分解

牛由来単球系細胞でのマウススクレイピー PrP<sup>Sc</sup> の分解性を代謝法で解析した。1%脳乳剤を添加して 1 日目に PK 処理しない場合で完全長の N 端側の領域が顕著に分解されているのが確認され、3 日目以降は PK 処理した場合と同じ PrP<sup>Sc</sup> バンドを示した。このことは、単球系細胞に取り込まれた脳乳剤は PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> の N 端側が分解され、PK 処理した場合と同様にコアの部分が分解しづらく残ることが明らかとなった。

PK 処理しない場合と PK 処理した場合の脳乳剤添加後の WB 解析の結果を図 2 に示した。その結果、PK 処理にかかわらず脳乳剤添加後 3 日目には PrP<sup>Sc</sup> が顕著に分解しているのが確認された。

この結果は、BSE プリオンを添加した場合でも同様であった。また、LPS 添加時で分解性が促進することが確かめられた。

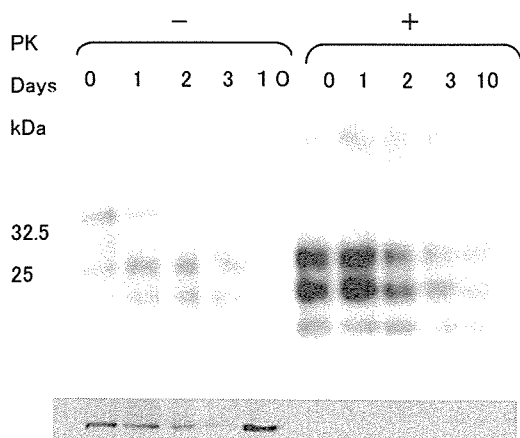


図2 牛末梢血由来の単球系細胞での PrP<sup>Sc</sup> の分解性

3) マウス培養系 Mφ での PrP<sup>Sc</sup> の分解性

マウス培養系 Mφ 株 RAW264.7 と J774 での PrP<sup>Sc</sup> の分解性を検査した。両細胞株とも FITC 標識ラテックスの取り込みは旺盛であり、FACS の成績からも Mφ であることが確認された。マウススクレイピー脳乳剤を添加後、吸着法にて PrP<sup>Sc</sup> の分解性を検査した。その結果、48 時間後には PrP<sup>Sc</sup> の分解されるラダーが WB で確認され、96 時後には検出されなくなった。両細胞とも PrP<sup>Sc</sup> の分解は旺盛であることが確認された。

4) マウス骨髄由来 Mφ と DC での PrP<sup>Sc</sup> の分解性

マウス骨髄から誘導される Mφ と DC に関して PrP<sup>Sc</sup> の分解性を解析した。残念ながらマウス脾臓から FDC を MACS にて分離を試みたが、感染実験に使える細胞数まで FDC を分離できなく、本実験では FDC での PrP<sup>Sc</sup> の分解性は検討できなかった。骨髄より誘導した Mφ は、MHC-II, CD68, CD33.1, 44B1 が陽性であり、DC は、MHC-II, CD11c, CD33.1 が陽性の細胞であった。骨髄から誘導した Mφ と DC 細胞はラテックス粒子をよく取り込む貪食能力を有した細胞群であった。

骨髄から誘導した Mφ の PrP<sup>Sc</sup> の分解性を図 3 に示した。骨髄から誘導した Mφ の PrP<sup>Sc</sup> の分解性は極めて旺盛であり、48 時間後では WB で検出されないまでに分解されていた。

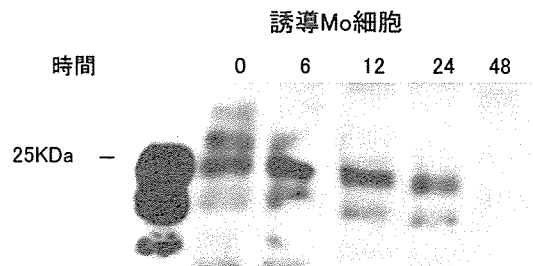


図3 骨髄から誘導した Mφ での PrP<sup>Sc</sup> の分解性

図 4 に骨髄から誘導した DC での PrP<sup>Sc</sup> の分解性を示した。骨髄から誘導した Mφ に比べて DC では PrP<sup>Sc</sup> の分解性が弱く、牛の培養 Mφ 同様に添加 3 日目ごろから顕著となり、WB で検出が困難になるまでには 6 日以上培養時間が必要であった。

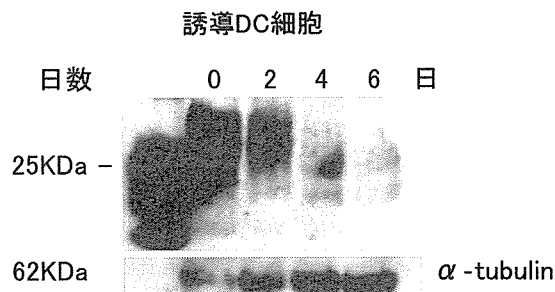


図4 骨髄から誘導した DC での PrP<sup>Sc</sup> の分解性

### 5) 牛の年齢に伴う PrP<sup>C</sup> の発現量の変化

牛の門部より lysis buffer にて 10%乳剤を調整後、超遠心 50,000r.p.m にて分離して可溶性画分 (S2) と沈殿画分 (P2) を得た。分離した両画分を WB にて各々の分子を解析した。超遠心にて分画した S2 画分と P2 画分の WB での成績を図 5 に示した。

S2 画分は PrP<sup>C</sup> 本来の分子像 (糖鎖による 3 つのバンド) を示したのに比べ、P2 画分の多くは N 端が欠損した短い PrP<sup>C</sup> 分子であることが明らかになった。若齢牛に比べて高齢牛では P2 画分の割合が全体的に多く検出された。また、高齢牛では若齢牛に比べて PrP<sup>C</sup> の発現量は平均的に少なく個体差が大きいことが観察された。

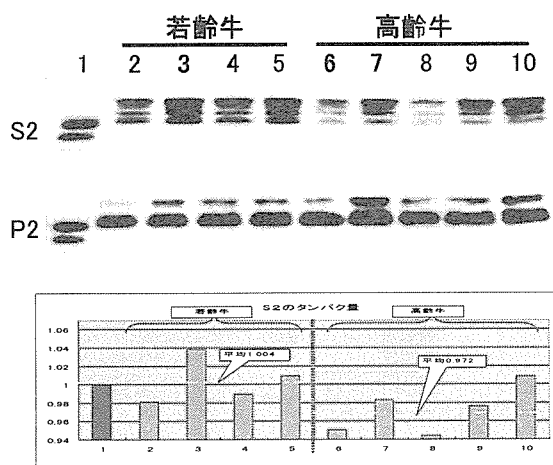


図5. 若齢牛と高齢牛での牛延髄門部における S2 画分と P2 画分の PrP<sup>C</sup> 発現

1: PK 処理 PrP<sup>Sc</sup>; 2: 22 ヶ月齢; 3: 22 ヶ月齢;  
4: 22 ヶ月齢; 5: 22 ヶ月齢; 6: 185 ヶ月齢; 7: 229 ヶ月齢;  
8: 195 ヶ月齢; 9: 178 ヶ月齢; 10: 146 ヶ月齢

### D. 考 察

昨年度に引き続き牛の免疫系細胞での PrP<sup>Sc</sup> の分解性について解析した。今回解析に用いたシャーレ付着細胞の多くは CD14、CD11b、

CD11c 陽性であり、旺盛な貪食能を有していることから、解析に用いた細胞は単球系細胞と考えられる。これら単球系細胞での PrP<sup>Sc</sup> の分解性は、牛培養系 Mφ Bo120 とほぼ同じレベルの分解性を示し、1%脳乳剤添加後 3 日目ぐらいから分解が顕著となり、10 日目には WB で検出できないところまで分解された。末梢血由来の単球系細胞での PrP<sup>Sc</sup> の蓄積性についても検討したが、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積や複製は検出されなかった。末梢血中での PrP<sup>Sc</sup> の分解性は示されたものの、局所組織に散在する Mφ での役割に関しては未だ明らかではない。BSE に感染した牛の腸管で時々 PrP<sup>Sc</sup> を取り込んでいる Mφ 様細胞を散見するが、その Mφ が PrP<sup>Sc</sup> を取り込み分解しているのか?あるいは PrP<sup>Sc</sup> が複製している像なのかは明らかではない。これまで、牛回腸より Mφ 系細胞を MACS 等で分離を試みてきたが、回腸のパイエル板からの Mφ の分離は極めて難しく、細菌のコンタミ等により PrP<sup>Sc</sup> を添加して培養するまでには至っていない。BSE 感染時の宿主の初期応答を腸管をモデルに解析するには更なる改善が必要であろう。

本年度はマウスモデルも導入して Mφ と DC での PrP<sup>Sc</sup> の分解性も検討したが、脾臓から感染実験に使用できる細胞数を得られなかったことから、FDC での PrP<sup>Sc</sup> の分解性は解析できなかった。この点も来年度以降の課題と考える。培養系のマウス Mφ や骨髄から誘導した Mφ や DC 細胞において PrP<sup>Sc</sup> が効率よく分解することが明らかとなった。今回の実験では DC 細胞の方が Mφ に比べて PrP<sup>Sc</sup> の分解に時間を要した。これは、今回骨髄から誘導した DC 細胞は Mφ 細胞に比べて誘導に時間がかかり細胞数も少なかったのではないかと考えられる。

非定型 BSE 罹患牛の多くが高齢牛であることから、牛の年齢と非定型 BSE の発症にはなんらかの関係があるのではないかと考えている。今年度は牛の年齢と PrP<sup>C</sup> 発現に何らかの関連があるのかを調べる目的でウシ延髄門部の PrP<sup>C</sup> 発現を検査した。高齢牛は若齢牛に比べて PrP<sup>C</sup> 発現に可溶性画分(S2)で個体差が大きいこと、また、沈殿画分(P2)が高齢牛で多くなることが明らかとなった。沈殿画分(P2)のほとんどは N 端側の欠失した領域部分であるこ

とも明らかとなった。これら両画分の PK に対する感受性等に関しても現在解析中であり来年度の課題としたい。

## E. 結 論

ウシの BSE 感染時の宿主の初期応答を明らかにする目的で、ウシの免疫系の細胞での PrP<sup>Sc</sup> の分解能や蓄積性に関して解析した。末梢血由来の単球系細胞においても PrP<sup>Sc</sup> の分解が観察された。また、マウスの培養 Mφ や骨髄から誘導される Mφ や DC についても解析を行い PrP<sup>Sc</sup> の分解性を確認した。さらに、ウシの年齢によるウシ延髄門部での PrP<sup>C</sup> の発現を解析し、高齢牛は若齢牛に比べて PrP<sup>C</sup> 発現の個体差が大きく、沈殿分画 (P2) が僅かに多くなることが確認された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Onoe S, Ohoba Y, Kitagawa H. and Ishiguro N: Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J Vet Med Sci* 68:2 7-33, 2006.
- 2) Yamaguchi S, Niida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H. and Horiuchi M: Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers. *Biochim Biophys Res Commun* 349: 485-491, 2006.
- 3) 石黒直隆:ゼラチン製造工程での BSE プリオンの不活化に関するバリデーション研究の概要. *食品衛生研究* 56: 35-42, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 佐々悠木子、伊藤志乃、児玉 道、猪島康雄、石黒直隆:ウシとマウスの免疫系細胞の異常型プリオン蛋白質の取り込みと分解能。2006 年プリオン研究会 (岩手) 2006 年 9 月
- 2) 大森保成、阿閉康郎、斉藤正一郎、上野博史、猪島康雄、石黒直隆:ウシの回腸を支配する外来性神経細胞の局在。2006 年プリ

オン研究会 (岩手) 2006 年 9 月

- 3) 大森保成、阿閉泰郎、斉藤正一郎、上野博史、猪島康雄、石黒直隆:ウシの回腸を支配する外来性神経細胞の局在。第 142 回日本獣医学会学術集会 (山口) 2006 年 9 月
- 4) 伊藤志乃、佐々悠木子、猪島康雄、石黒直隆:マウス免疫系細胞による異常型プリオン蛋白質の取り込みと分解能。第 142 回日本獣医学会学術集会 (山口) 2006 年 9 月
- 5) 佐々悠木子、児玉 道、猪島康雄、石黒直隆:牛マクロファージでの異常型プリオン蛋白質の取り込みと分解能。第 142 回日本獣医学会学術集会 (山口) 2006 年 9 月
- 6) 石黒直隆、猪島康雄、佐々悠木子、中島真一:ニワトリ正常プリオン蛋白質に対する抗体の作成とその性状解析。第 142 回日本獣医学会学術集会 (山口) 2006 年 9 月
- 7) 佐々悠木子、伊藤志乃、児玉 道、猪島康雄、石黒直隆:ウシとマウスの免疫系細胞による異常型プリオン蛋白質の取り込みと分解能。第 54 回ウイルス学会学術集会プログラム (名古屋) 2006 年 11 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

# 10. 霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究

分担研究者 寺尾 恵治 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

研究協力者 小野文子 ((社) 予防衛生協会)

山河芳夫 (感染研・細胞病理部)

高橋秀宗、佐多徹太郎 (感染研・感染病理部)

研究要旨 ヒトの変異型 CJD (vCJD) 発症リスク評価指標を確立する目的で、カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 感染モデル作出の検討を行った。BSE 感染ウシ脳乳剤を 2 歳齢カニクイザルに経口投与 (3 頭) および脳内接種 (3 頭) し、無処置の 1 頭を加え計 7 頭について BSL3 アイソレーター飼育環境下で、経時的に運動機能試験、記憶能試験、脳波測定による神経機能解析を行った。発症動物において安楽死直後 MRI 撮像、病理検索および WB 法による変異型プリオン蛋白の検出を行った。脳内接種した 3 頭中 2 頭において接種後 26 ヶ月目頃より神経症状が認められ、振戦、驚愕反応、失調症状が観察され緩徐進行性に経過し約 1 ヶ月後に起立不能となり、安楽死を行った。アップルテストによる運動機能評価において、発症動物で報酬回収時間の遅延が認められた。指迷路試験による記憶能試験では神経症状発現初期において成功率に顕著な変化は認められなかったが、迷路実施中の折り返し操作の増加傾向が観察された。また症状進行に伴い急激な成功率の低下が認められた。MRI では視床枕に T1 強調画像で高信号領域が認められた。病理組織検索においてはヒト vCJD と同様の florid plaque に相当すると考えられる免疫染色像が認められ、神経組織の WB においても、vCJ の異常型プリオンと同様の 2B 型 (4 型) のバンドが検出された。BSE 感染カニクイザルにおいて高次脳機能の評価系及び生体材料を用いた早期診断系を確立することにより、治療、予防研究に寄付するとともに、移植、輸血等生物製剤由来医原性感染のリスク評価に有用と考えられる。

## A. 研究目的

カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 感染モデルを作成し、変異型 CJD の病態解明および早期診断法を確立することによりヒトの BSE 発症リスク評価指標を確立するとともに、BSE-P 接種後継時的に採取した血液、髄液、主要組織を研究班共通の研究資源として提供することを目的とする。

変異型 CJD 患者では行動異常、記憶力低下とともに孤発型 CJD 患者とは異なる臨床症状、脳波の変化、MRI 像および、病理所見が報告されている。今年度は発症カニクイザルの臨床診断及び病理学的解析を行い、霊長類を用いた BSE-P 感染モデルの有用性について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 実験群

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

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

実験に使用したカニクイザル 7 頭についてプリオンタンパク質遺伝子のコドン 129 について遺伝子型の検索を行った。

### 2) 解析方法:

#### ① 行動解析

指定行動観察・ビデオ撮影

アップルテスト (運動機能評価)

#### ② 記憶能解析

### 指迷路試験

#### ③ 神経機能解析

大脳皮質脳波測定

#### ④ MRI 撮像 (安楽死直後)

#### ⑤ 蛋白解析

#### ⑥ 病理検索

#### ①行動解析

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し、報酬を得るまでの時間を計測した。トレイの近い位置から順番に4段階に薄切りリンゴをおき左右各4試行計32試行を実施し、トレイ入り口から手を出して報酬をつかみ、ケージ内に手を引き込むまでの時間を計測し各段階の平均値を求めた。

#### ②指迷路試験

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便におこなう装置であり、4段の指迷路装置内に置かれた報酬を移動させ、最終的に取りだし口から獲得する方法を学習させうえで、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテスト(24試行)を2日連続で実施し、成功率を長期記憶の評価とした。また、指迷路試行中にみられる折り返し行動、停止行動に着目し、思考経過についての検討を行った。

#### ③神経機能解析

脳波は塩酸ケタミン-キシラジン混合麻酔下において、4電極もしくは6電極誘導による皮質脳波の測定を行い経時的変化について解析を行った。

#### ④MRI 撮像

BSL3 感染実験であることから、現状では感染動物の実験区からの搬出は不可能である。そのため、発症後安楽死を行った2頭について、安楽死後、アクリル製密封型コンテナに動物を保定してMRI撮像室への移動を行った。MRI撮像は3T MRI装置(MAGNETOM Allegra [Siemens社])を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高いS/Nを持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルのCP型コイルを用いてT1, T2, プロトン強調画像、Flair画像を撮像した。

#### ⑤蛋白解析

発症し安楽死を行った2頭について、血液、脳脊髄液及び全臓器についてプロテアーゼ抵抗性を獲得した異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)について、ウエスタンブロット(WB)法により検索を行った。

#### ⑥病理検索

発症し安楽死を行った2頭について、脳神経系、リンパ系及び全臓器について病理検索を行い、異常型プリオン発現細胞における異常型プリオン蛋白の局在について免疫組織学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

BSE-P接種動物はすべて改良型のP3アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚、聴覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするよう改良した。また、材料採取および脳波測定においては麻酔下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応及び輸液療法等による維持管理をおこなった。

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、ペントバルビタール静脈内投与による深麻酔状態で実施した。肋間より経皮的に心臓に穿刺し全採血による放血を行い、最後に過剰量のペントバルビタールを投与し死亡を確認した。

### C. 研究結果

#### 1) 遺伝子型の検索

実験群7頭のカニクイザル末梢血を用いてプリオンタンパク質遺伝子のコドン129解析を目的としてnest PCR、direct sequenceを行ったところ、全てMet/Metであった。

実験に用いたカニクイザルは全てTPCで育成した2世代もしくは3世代カニクイザルである。脳内接種を行い発症した2頭はフィリピン現産家系であり、未発症動物はマレーシア現産家系であった。また経口投与群及びコントロール個体はマレーシアおよびインドネシア現産家系カニクイザルであった。

#### 2) 体重及び行動観察:

接種は生後740日から860日に実施しているが、脳内接種群において3頭中2頭(#7、#11)で、接種後の体重増加率が低い傾向が認められ



た。#10は他群と同様の成長を示したが、神経症状発現後体重の減少が認められた (Fig.1)。

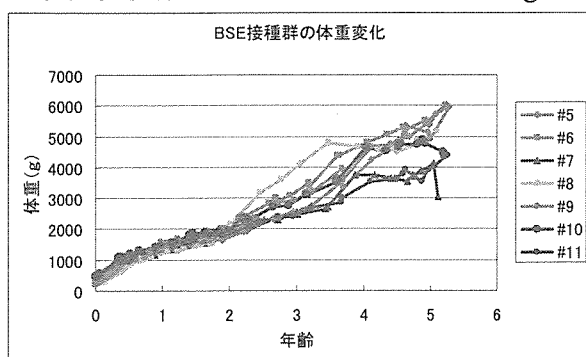


Fig. 1 BSE 接種カニクイザルの体重変化

行動観察では脳内接種群の 2 頭において明らかな神経症状の発現が認められた。

#7: 接種後 27 ヶ月目頃散発的な食欲不振が認められた。30 ヶ月目に食欲不振とともに過敏行動 (外界や隣ケージサルからの刺激による驚愕反応) が観察された。32 ヶ月目に、振戦、四肢の麻痺が観察され症状は進行し、36 ヶ月目に起立不能となり、全麻痺状態となり横臥した。意識は鮮明で口元に餌を持っていくと咀嚼、嚥下運動には異常は認められなかったため、青果及び流動食の直接経口投与と輸液管理により 10 日間維持し症状観察後安楽死を実施した。

#10: 接種後 26 ヶ月目に突発的な振戦が観察された。28 ヶ月目に#7 と同様の過敏行動が観察され、あくびの頻発と共に、間断的な振戦が認められた。驚愕反応は顕著に進行し、四肢の不全麻痺が観察されているにもかかわらず、外界刺激に対して全身での逃避行動を示した。30 ヶ月目に自力での起立が困難となり、前肢でケージ網を持ってささえての起立を行う状態となった。33 ヶ月目に全身の持続的な振戦が観察され 35 ヶ月目に安楽死を実施した (Table 1)。

	脳内接種			経口接種			無接種
	#007	#010	#011	#005	#006	#009	
接種年齢	2Y1M	2Y4M	2Y4M	2y3M	2y3M	2Y5M	2Y1M
神経症状発現	30M	26M					
成長遅延	++		++				
痒うつ		+++	+				
自虐行動	+			+			+
過激	+++	+++					
性格変化			+		+	+	
舞踏症状							
小脳失調	+++	+++					
ミオクローヌス	+++	+++					
食欲不振	+~						
麻痺	+++						
起立不能	+++						

Table 1 BSE 接種カニクイザルの臨床症状

### 3) 運動機能評価: アップルテスト

アップルテストにおける報酬獲得時間を経時的に測定したところ、脳内接種群 3 頭中発症が認められた 2 頭 (#7, #10) について、神経症状発現後、左右前肢とも報酬獲得時間の遅延が認められた。発症が認められていない #11 及び経口投与群、コントロール群では報酬獲得時間に変化は認められなかった。報酬獲得時間の遅延は報酬までの距離に明らかな相関が認められておらず、動作全体の緩慢傾向よりも動作開始時及び、つかみとり行動時における異常が顕著であった (Fig.2)。

### 4) 高次脳機能評価: 指迷路試験

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便に行う試験であり、4 段指迷路装置内に置かれた報酬を移動させて、取り出し口から獲得する方法を学習させて上で、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテスト (24 試行) を 2 日連続で実施し、正答率を長期記憶の評価とした。

脳内接種後神経症状が認められた 2 頭について症状発現初期では正答率の低下は認められなかったが、症状の進行とともに、2 頭とも急激な低下が認められた。脳内接種後発症が認められない #11、経口投与群の 3 頭中 2 頭およびコントロール個体では 90% 以上の正答率を維持していた。経口投与群の #5 において、接種後 16 ヶ月目頃から正答率が 80~90% と不安定な傾向が認められた (Fig3)。

また、指迷路試験を実施していく上で症状発現とともに、認められるようになった試験中にリンゴを左右に折り返して成功のルートに悩む動作や試行中に装置から手を放す停止行動が頻繁に観察されるようになったことから、過去のデータを含めて行動パターンの解析を行った。

接種後 10 ヶ月目前後で全群とも折り返し行動が頻発している傾向が認められているが、この時期、施設の P3 施設の工事期間と重なり周囲の雑音や移動のストレスの影響が似夜可能性が考えられた。脳内接種群ではその後も成功率の如何に関わらず折り返し回数が高い傾向が認められ #10 では発症後成功率の低下とともに折り返し回数の増加が認められた。停止回数は脳内接種後発症した 2 頭 (#7, #19) において症状発現に伴い急激な増加が認められた。

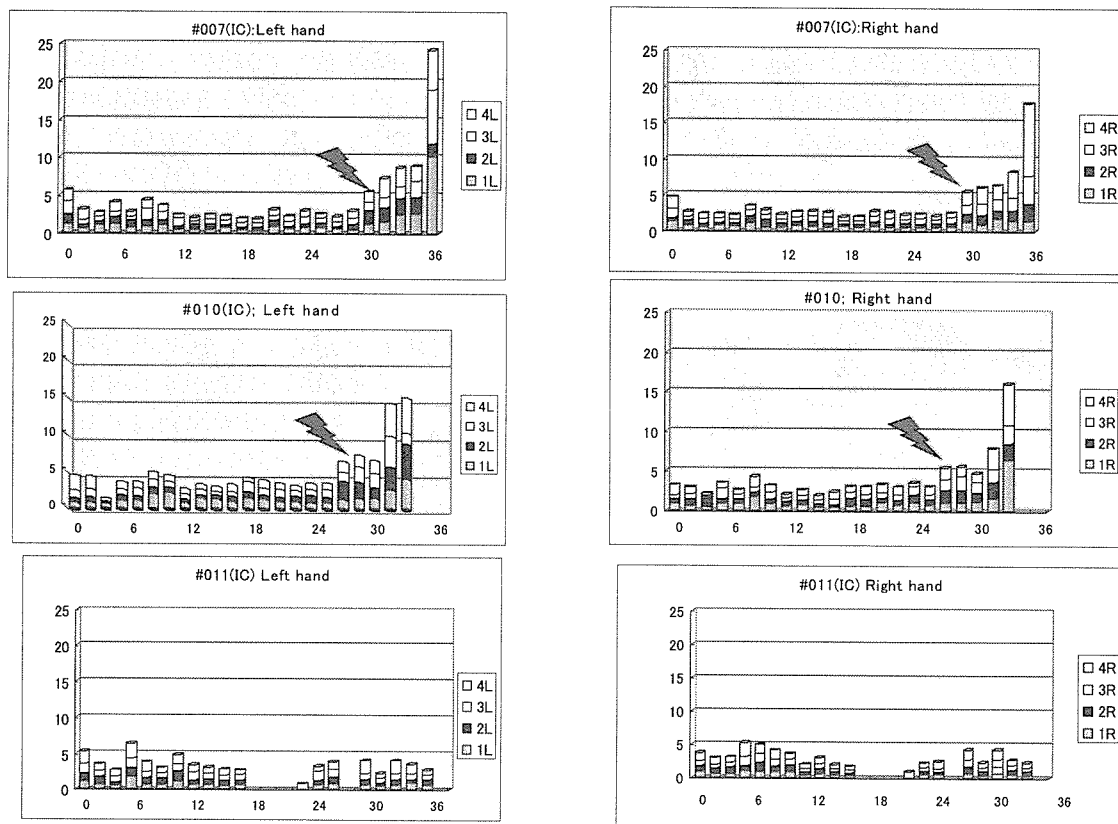


Fig.2 BSE 脳内接種群におけるアップルテスト報酬獲得時間の経時的変化(赤稲妻マークが神経症状発現時期)

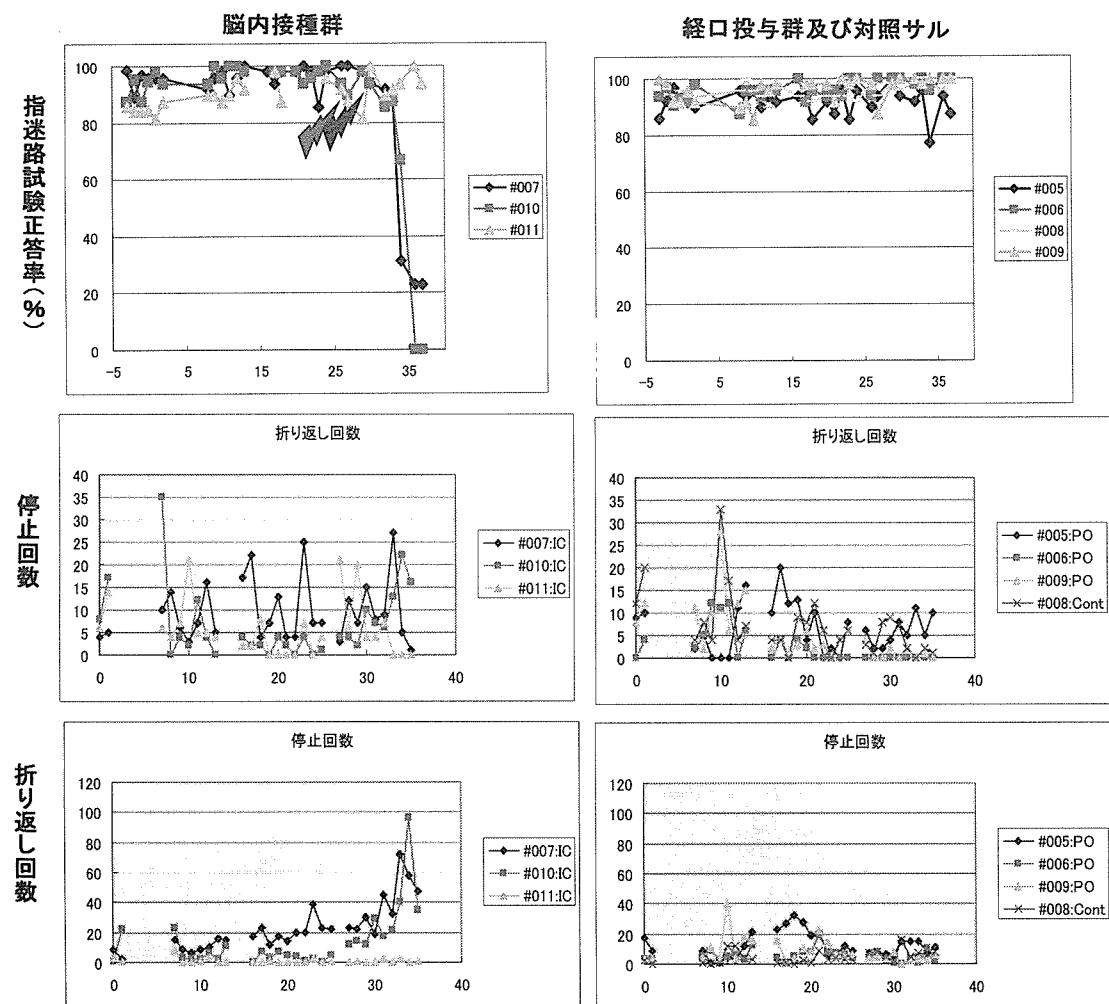


Fig.3 BSE 接種カニクイザルにおける指迷路試験正答率、折り返し回数および停止回数の経時的変化

## 5) 皮質脳波

全頭において経時的に脳波の低振幅化が認められたが、これはサルの成長に伴う皮膚、筋の発達に対応して電極環境（抵抗の増大）の変化によるものと考えられる。

#7: 接種後 16 ヶ月目  $\delta$  波の群発射の周期性に変化（持続時間の変化、周期の不規則性）が認められ、26 ヶ月目では  $\delta$  波の群発射の持続時間は延長し、周期も長くなっていた。36 ヶ月目ではその所見が著しくなり、 $\delta$  とより周期の速い 10Hz の成分の振幅を比較すると Pre から時間を経るにしたがって小さくなっていることから、 $\delta$  成分の低振幅化が進行していると考えられた。

#10: 接種後 7 ヶ月目頃より低周波成分 ( $\delta$ ) の周期的出現がより不明瞭であった。16 ヶ月目も同様の所見が観察され、極性の偏った波が認められた。28 ヶ月目では  $\delta$  波は疎、不明瞭になりその周期は延長、持続時間が延長し、35 ヶ月目ではさらに低振幅化が進行した。

## 6) MRI所見

安楽死直後に密封コンテナ内に頭部を固定しP3感染実験区よりMRI室へ動物を移動して撮像を行った。安楽死後の他症例の所見と比較したところ、視床枕においてT1強調像およびFLAIR画像で高信号領域が観察され、小脳皮質において境界明瞭な高信号領域が見られた。しかし、T2強調画像では低信号の所見を示していた。全身麻痺症状を示し10日間生存した#7では脳室の拡大が認められた (Fig.5)。

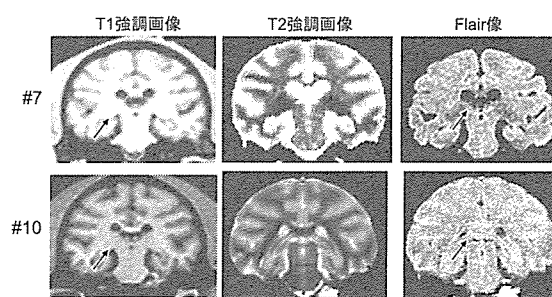


Fig.5 脳内接種後発症カニクイザルの安楽死後の MRI 所見

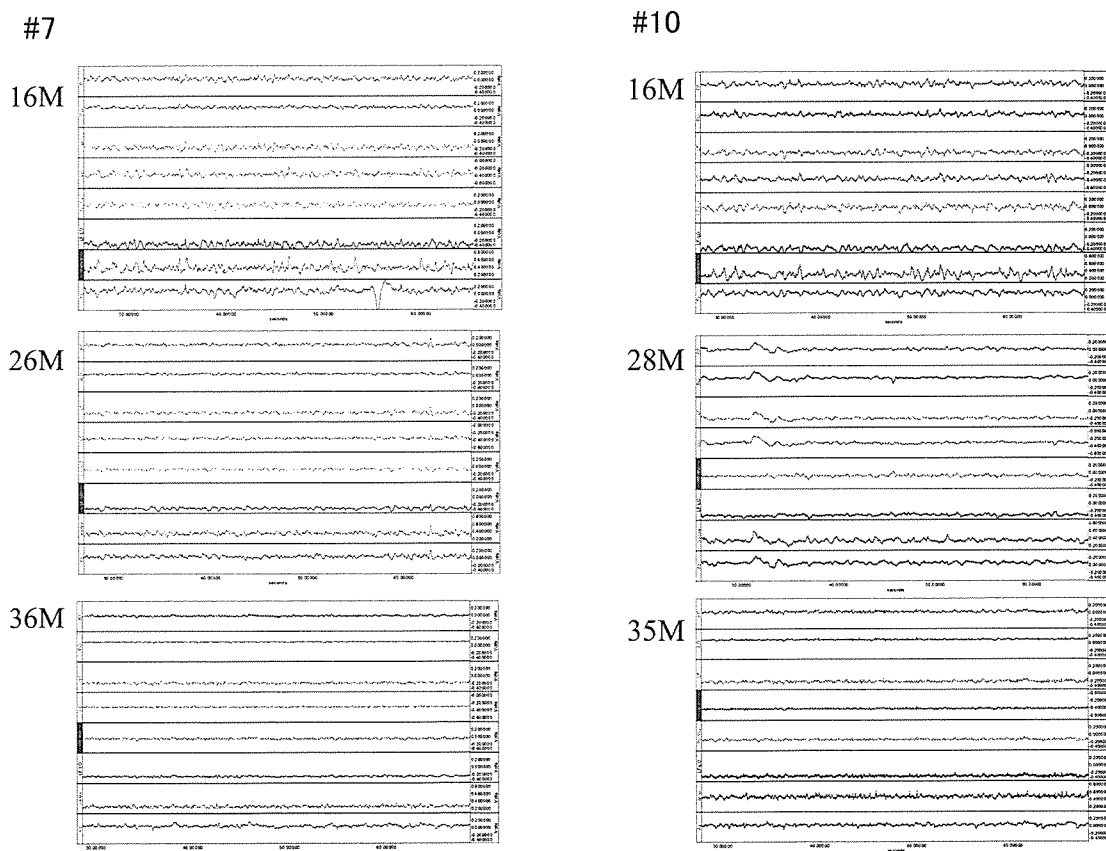
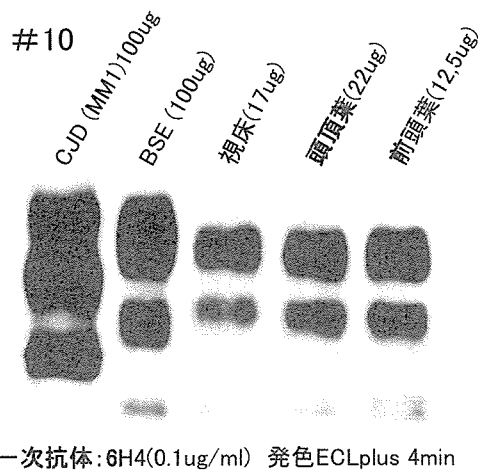


Fig.4 脳内接種後発症カニクイザルの脳波の経時的変化

## 7) 蛋白解析

発症し安楽死を行った2頭について、血液、脳脊髄液及び全臓器についてプロテアーゼ抵抗性を獲得した異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) について、ウエスタンブロット (WB) 法により検索を行った結果、中枢神経組織から高い濃度で異常型プリオン蛋白質が検出された。検出されたバンドは vCJ の異常型プリオン 2B 型に属し、非糖鎖型分子は BSE のそれと同一サイズであった (Fig.6、Table 2)。



一次抗体: 6H4(0.1ug/ml) 発色ECLplus 4min

Fig.6 WB 法による PrP<sup>Sc</sup> の検出 (#10)

BSE プリオン接種サルの PrP<sup>Sc</sup> の分布 (WB)

		#7	#10		
中枢神経系	脳	+++	+++	リンパ系組織	
	脊髄	+++	+++	胸腺	-
	視神経	+++	++	脾臓	-
				副腎	-
末梢神経系	網膜	+++	+++	扁桃	-
	三叉神経	++	++	回腸遠位部	-
	迷走神経	+	-	リンパ節	
	正中神経	+	N.D.	顎下リンパ	+
	肋間神経	+	N.D.	肺門リンパ	-
	交感神経	+	N.D.	腋下リンパ	-
	腹腔神経叢	+	-	腸間膜リンパ	-
	座骨神経	+	-	鼠径リンパ	-
		+++ : ~10ug, ++ : 1~5mg		+++ : ~200ug - : 10mg	

Table 2 WB 法による PrP<sup>Sc</sup> の分布

## 8) 病理検索

発症し安楽死を行った2頭について、末梢神経を含む脳神経系、リンパ系、消化器系等全臓器について病理検索を行い、異常型プリオン発現細胞における異常型プリオン蛋白質の局在について免疫組織学的解析を行ったところ小脳、視床に従来の BSE と同じ細顆粒状のプリオ

ンの陽性像がみられ、大脳皮質には florid plaque に相当すると考えられる免疫染色像が認められた。海綿状変性も観察された (Fig.7)。

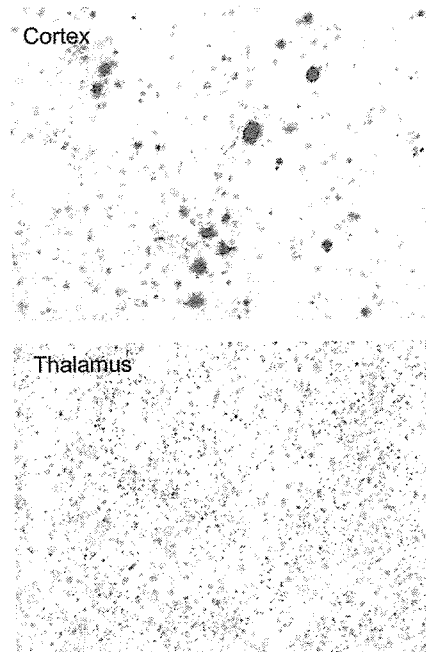


Fig.7 免疫組織検索による PrP<sup>Sc</sup> の検出 (#10)

## D. 考察

BSE 感染ウシ脳乳剤を脳内接種したカニクイザル3頭中2頭において接種後26~27ヶ月目頃より神経症状が観察され、35~36ヶ月目に安楽死を実施した。

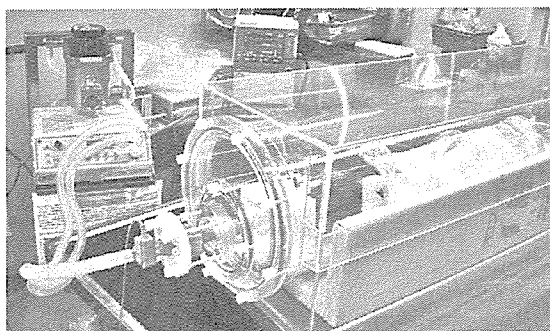
経過は緩徐進行性で2頭とも約10ヶ月の罹患期間を有した。症状は驚愕反応を伴う過敏反応、運動機能障害、記憶障害が認められた。また2例とも進行性の失調症状が観察され振戦は症状進行に伴い持続的に観察されるようになった。これらの臨床症状はヒト vCJD に認められる症状と類似していた。

今回実験に供したカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子コドン129番は Met/Met 型であり、ヒト vCJD 発症患者全例と同じ遺伝型であった。また、ほぼ同時期に発症が認められた2例が同一原産由来のカニクイザルであったことから、今後さらに発症リスク分析において遺伝的解析を進めていくことが有用であると考えられた。

脳波所見では症状が進行した状態においても特徴的な異常所見は観察されなかったが、今後、詳細な周波数解析とともに視覚、聴覚及び

体性感覚誘発電位の解析を行い発症初期の異常の有無について検討をすすめていく。

MRI 画像では、T1 強調画像で視床枕に高信号領域が観察された。ヒト vCJD において拡散強調画像や FLAIR 画像で視床枕に高信号領域が認められている所見（視床枕徴候：pulvinar sign）に相当している可能性が示唆された。また、小脳皮質にも境界明瞭な顕著な高信号領域が観察された。しかし、今回の撮像は BSL3 感染実験中の動物であり、P3 感染実験施設からの生体の搬出ができないため、安楽死後の撮像であった。死後変化の影響の可能性について検討が必要であるとともに、近年ヒトのプリオン病早期診断で用いられている Diffusion 画像は死後の撮像は不可能であることから、現在、呼吸器付き密封コンテナの開発を進めている。今後は BSE 感染カニクイザルを用いた MRI 早期診断を可能としたい。



呼吸フィルター付き密封コンテナ

ウェスタンブロット（WB）法による異常型プリオン蛋白質の検索においては 2 例とも中枢神経系に高濃度の分布が認められた。また、全身麻痺症状を示した後 10 日間維持した#7 では末梢神経からも検出されたことから、異常型プリオン蛋白が神経向性に遠心的に広がっていると考えられ、臨床症状の進行と合致していた。また、その広がりはかなり急速であることが示唆された。

病理検索においては、中枢神経系において海綿状変性ととも異常型プリオン蛋白が広範に検出され、その形状は BSE 及びヒト vCJD と同様の florid plaque に類似していた。

## E. 結論

カニクイザルを用いたプリオン病発症モデル系の確立は高次脳機能、画像診断による評価

系確立と生体材料を用いた早期診断系を確立することにより、治療、予防研究に寄付するとともに、移植、輸血等生物製剤由来医原性感染のリスク評価に有用と考えられる。今後、変異型 BSE 感染におけるカニクイザルの病態解析、輸血伝播による発症リスクの解析を進めていくとともに、発症サル由来脳乳剤を用いた感染モデルを作成することにより、早期発症モデル系を確立する。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

- 1) 小野文子、田勢直美、冷岡昭雄、大山 篤、土田順子、和田直己、山河芳夫、佐多徹太郎、寺尾恵治：カニクイザルを用いた BSE 発症モデル系の確立。第 142 回日本獣医学会（山口）2006.10.
- 2) 小野文子、田勢直美、冷岡昭雄、大山篤史、川崎勝義、土田順子、村松慎一、佐多徹太郎、寺尾恵治：アップルテストによるカニクイザルの神経疾患モデルの機能解析。第 22 回日本霊長類学会（大阪）2006.7.

## H. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

# 1 1. BSE 脳内感染実験牛のプリオン体内分布

分担研究者 扇 勉 北海道立畜産試験場 基盤研究部

研究協力者 福田茂夫、二階堂聡、松井義貴、陰山聡一、  
尾上貞雄（北海道立畜産試験場基盤研究部）、  
横山 隆、岡田洋之（動衛研・プリオン病研究センター）

研究要旨 脳内接種による BSE 実験感染牛 13 頭を用いて、異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の体内分布をウェスタンブロット法により検索した。13 頭すべての脳幹部組織から PrP<sup>Sc</sup> を検出した。臨床症状の有無による比較では、臨床症状出現前に PrP<sup>Sc</sup> が脳全体に分布することが明らかになった。また末梢神経組織では、発症前より脊髄神経節や三叉神経節、視神経および網膜などで PrP<sup>Sc</sup> が検出された。BSE の臨床症状の出現よりも 6 ヶ月早く、脳幹部からの PrP<sup>Sc</sup> 検出が可能であると示唆された。PrP<sup>Sc</sup> は、中枢から下行性に末梢神経組織へ伝播すると考えられるが、筋肉やリンパ組織、腸管への蓄積は確認できなかった。

## A. 研究目的

2001 年 9 月に我が国で初めて BSE が確定診断されて以来、これまでに 31 例の BSE が発生している。国内では、食肉用牛全頭を対象とした BSE スクリーニング検査と特定危険部位の除去により、食肉から人への BSE 感染リスクは排除されている。しかしながら、BSE におけるプリオンの体内分布に関して、未だ不明な点も多く、さらに国内の研究で特定危険部位以外の組織から異常型プリオン蛋白質を検出した報告もある。BSE の感染および発症機構を解明するため、BSE の牛への感染実験は不可欠である。

本研究は、BSE 感染牛脳乳剤を牛に脳内接種し、実験感染牛の諸臓器におけるプリオンの体内分布を解析する。本年度は BSE 実験感染により BSE を発症した 9 頭および発症前に病理解剖した 4 頭についてプリオン体内分布を解析した。

## B. 研究方法

### 1) 供試動物

2~4 ヶ月齢のホルスタイン種雌 18 頭に対し、2004 年 2、7、9 月に 10% BSE 感染脳乳剤 1ml を 15 頭 (BSE 脳内接種牛) に、BSE 陰性を確認した脳乳剤を 3 頭に脳内接種した。フリーバーン方式専用隔離牛舎 (動物バイオセーフティ

一基準 (ABSL) 1) にて飼養し、臨床症状の観察を行った。臨床症状の変化があった BSE 脳内接種牛 9 頭 (発症後解剖牛) について、経過観察後、動物衛生研究所プリオン病研究センターの ABSL3 施設内において病理解剖を行った。また BSE 脳内接種牛のうち臨床症状が現れていないそれぞれ接種 12、16、18、19 ヶ月後の 4 頭 (発症前解剖牛) について同様に病理解剖した。

### 2) 組織材料の保存

病理解剖時に各組織を採取した (図 1)。採取した組織は、生化学検査用に -80°C、また病理組織および免疫組織化学検査用にホルマリン固定した上、一時保管した。

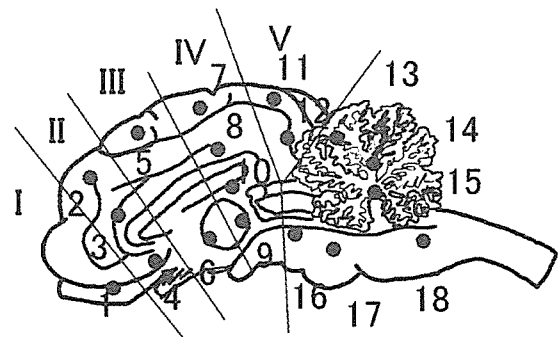


図1 脳組織の採材部位

1: 脳 I、2~4: 脳 II、5~6: 脳 III、7~10: 脳 IV、11~12: 脳 V、13~15: 小脳、16~18: 脳幹部 (中脳、橋、延髄門部)

### 3) 異常型プリオン蛋白質の検出

生化学検査用保存組織を用い、ウエスタンブロット法による異常型プリオン蛋白質の検出を行った。脳組織はそれぞれ 200±20mg をφ1mm ジルコニア製ビーズ入り 2ml チューブに入れ、800μl の TN buffer (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl) を加えた後、マルチビーズショッカー(安井器械)で破砕処理し 20 脳乳剤とした。250μl の 20%脳乳剤および等量の Detergent buffer (4% Zwittergent3-14, 1% Sarkocyl, 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl) を 1.5ml チューブで混合し、250μg の Collagenase および 20μg の DNase を添加した。37°C、30 分間インキュベーションした。25 μl の 2-Butanol を加え混和後、20mg/ml のプロテアーゼ K1μl を添加し、37°C、30 分間消化処理した。2.5 μl の 0.4M Pefabloc を加えた後、Butanol-Methanol 混合液を 250μl 加え、ゆっくり混和後、20000×g、10 分間遠心分離した。上清を捨て、沈渣を軽く乾燥させた後、100 μl の SDS サンプルバッファーを添加し、100°C、6 分間ボイルした。混和しさらに遠心分離した上清を測定サンプルとした。

また脳以外の組織は Shimada ら (Microbiol Immunol 48(8), 2005) の方法を用いた。すなわち各組織 200 mg ± 20 mg をハサミで細切した後、2 ml チューブに移しメタルコーン(安井器械)を入れた。2% Triton X-100、0.5% Sarkosyl、100 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、20 mg

Collagenase、および 40 μg DNase を含む 50 mM Tris-HCl を 800 μl 添加し、37°C、2 時間転倒混和した。55 μl の Butanol を添加し、80 μg のプロテアーゼ K を入れ、37°C、1 時間転倒混和した。2mM の Pefabloc で反応を停止させた。68000×g、20 分間遠心分離し、沈渣を 6.25% Sarkosyl/TE 900 μl 加え、1 時間の転倒混和により完全に溶解させた。9,000×g、5 分間遠心分離し、上清を 1.5ml チューブに移した。70 μl の 4%リンタングステン酸ナトリウム (Na-PTA) を加え、37°C、2 時間転倒混和し、20,000×g、30 分間遠心分離した。上清を捨て、20 μl の SDS サンプルバッファーを添加し、100°C、6 分間ボイルした。混和しさらに遠心分離した上清を測定サンプルとした。

SDS-PAGE は NuPAGE 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen)を用い、各サンプルをそれぞれ 10 μl (脳組織 5 mg 組織等量、その他の組織 100 mg 組織等量) ウェル入れた。200V、40 分間の電気泳動を行った。プロットはタンク式装置を用い、90V、60 分間、PVDF メンブレンに転写した。転写後、メンブレンをブロッキングおよび洗浄し、HRP 標識 T2 マウスモノクローナル抗体を 5,000 倍希釈で室温、1 時間反応させた。化学発光試薬 SuperSignal West Dura (PIERCE) および Alpha Ease Fc により検出を行った。

表1 脳組織におけるウエスタンブロットによる PrPSc の検出

牛剖検 No. 接種後経過月	発症前解剖牛				発症後解剖牛								
	1	4	10	7	11	2	3	5	12	13	6	8	9
	12	16	18	19	20	21	22	23	23	23	24	24	24
脳1	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳2 皮質	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳2 髄質	++	—	—	++	++	+	++	+	+	—	±	—	+
脳2 線条体	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	—	++
脳3 皮質	—	—	—	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++
脳3 視床	++	—	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳4 皮質	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
脳4 髄質	—	—	—	++	++	—	++	+	++	++	±	+	+
脳4 視床	—	ND	++	++	ND	ND	++	++	++	ND	++	++	ND
脳4 海馬	++	—	±	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳5 皮質	++	—	—	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++
脳5 髄質	—	—	—	++	++	+	+	++	+	—	+	++	+
小脳 皮質	—	—	++	±	+	++	++	++	++	++	++	++	++
小脳 髄質	++	—	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
小脳 脚	ND	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳幹 中脳	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳幹 橋	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脳幹 延髄門	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
脊髄(頸膨大)	ND	++	++	++	+	ND	++	++	++	++	++	++	++
脊髄(腰膨大)	ND	++	++	++	++	ND	++	++	++	++	++	++	—

++:PrPSc 陽性、+:PrPSc 陽性(<Mo Sc 1.6\*g)、—:陰性、±:判定不能、ND:Not Done

(倫理面への配慮)

サンプル採取および検査、死亡牛の剖検は、全牛の BSE 感染を前提として実施し、研究者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立畜産試験場動物実験委員会に承認された実験指針に従って行った。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

### C. 研究結果

13 頭すべての牛において、中脳、橋および延髄門部から PrP<sup>Sc</sup> を検出した (表 1)。また網膜においては、採取した 12 頭中 11 頭で PrP<sup>Sc</sup> 陽性であった。発症後解剖牛 9 頭および発症前解剖牛の 1 頭 (接種 19 ヶ月後) においては脳および脊髄のほぼ全域から PrP<sup>Sc</sup> が検出された。しかし、接種 12、16、18 ヶ月後の発症前解剖牛 3 頭の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は脳幹部、小脳、視床および線条体など一部に局限していた。

同一材料 (英国 BSE 脳乳剤) を接種した牛 5 頭について比較したところ、PrP<sup>Sc</sup> の脳内分布を比較したところ、接種後の経過期間に従い、未発症期においては、脳幹部から小脳に PrP<sup>Sc</sup> に分布し、発症期には脳組織全体に広がる像が確認された (図 2)。末梢神経組織においては、脊髄神経節では、発症前解剖牛 (接種 16、19 ヶ月後) からも PrP<sup>Sc</sup> が検出された。三叉神経節では、13 頭のうち、接種 16 ヶ月後の未発症牛を含む 10 頭で PrP<sup>Sc</sup> を検出した。発症後解剖牛 7 頭および発症前解剖牛 1 頭 (接種後 19 ヶ月) では、迷走神経、交感神経幹、星状神経節、腕神経叢、正中神経、坐骨神経、および副腎 (図

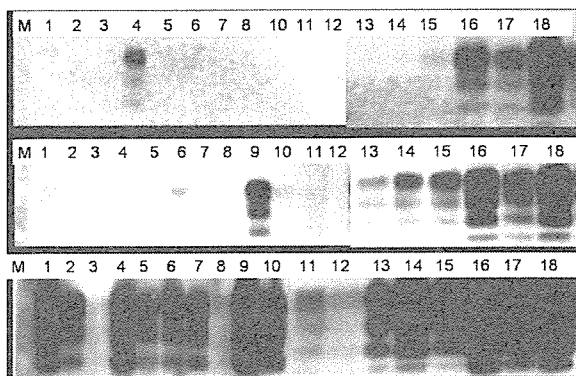


図 2. 同一材料接種牛の接種後経過期間による分布の違い  
上段) 接種 16 ヶ月後の発症前解剖牛  
中段) 接種 18 ヶ月後の発症前解剖牛  
下段) 接種 24 ヶ月後の発症後解剖牛  
(抗体 T2-HRP、×5000)

3) などの頭部および脊柱以外の末梢組織からも PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が認められた (表 2)。

3 頭の未発症牛 (接種後 12、16、18 ヶ月) および 2 頭の発症牛 (接種後 23 および 24 ヶ月) では頭部および脊柱以外の末梢神経から PrP<sup>Sc</sup> は認められなかった。すべての牛で、脾臓、扁桃、回腸、最長筋など神経系以外の組織における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積は認められなかった。

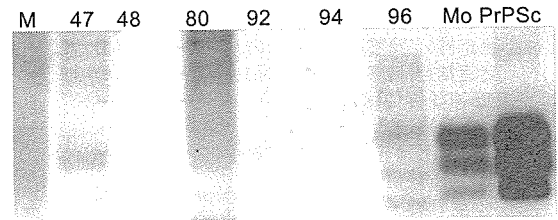


図 3. 副腎 (96) からの PrP<sup>Sc</sup> の検出  
(接種 23 ヶ月後に解剖した発症後解剖牛)

### D. 考 察

接種 12 ヶ月後に解剖した発症前解剖牛より脳幹部から PrP<sup>Sc</sup> が検出され、これは発症後解剖牛が臨床症状を呈した最も早い時期より 6 ヶ月早かった。BSE 脳内接種牛において、PrP<sup>Sc</sup> は発症前には、すでに中枢神経系全域に拡散していることが示唆された。PrP<sup>Sc</sup> の末梢神経における蓄積は接種後の経過期間と関連すると考えられた。今回の結果は、脳内接種であることから、中枢から末梢への下降性の BSE プリオンの伝播を反映すると考えられる。しかし BSE プリオンの体内伝播の解明には、野外発症例、経口感染例での PrP<sup>Sc</sup> の分布と比較検討が必要である。

### E. 結 論

今回までに解剖した BSE 脳内接種牛 13 頭すべてから PrP<sup>Sc</sup> を検出し、BSE の感染を確認した。BSE の臨床症状の出現よりも 6 ヶ月早く、脳幹部からの PrP<sup>Sc</sup> 検出が可能であると示唆された。PrP<sup>Sc</sup> は、中枢から下行性に末梢神経組織へ伝播すると考えられるが、筋肉やリンパ組織、腸管への蓄積は、確認できなかった。



表 2. 末梢組織からの PrP<sup>Sc</sup> の検出

牛剖検 No. 接種後経過月	発症前解剖牛				発症後解剖牛								
	1 12	4 16	10 18	7 19	11 20	2 21	3 22	5 23	12 23	13 23	6 24	8 24	9 24
脊髄神経節(頸膨大)	ND	++	-	++	-	ND	++	++	++	++	+	++	-
脊髄神経節(腰膨大)	ND	-	-	-	-	++	++	++	++	-	+	-	-
視神経	-	-	-	++	-	++	++	++	++	++	++	+	ND
網膜	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	ND
顔面神経	ND	-	-	+	-	±	-	-	++	-	+	-	-
舌下神経	ND	-	-	+	-	-	±	-	ND	ND	+	-	ND
下垂体	±	+	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++
三叉神経節	±	+	±	++	+	++	++	++	++	++	++	++	-
前頸神経節	ND	-	-	+	+	±	++	+	+	++	++	++	-
迷走神経(頸部)	ND	-	ND	+	+	±	+	++	+	-	+	+	-
迷走神経(胸部)	ND	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
交感神経幹(胸部)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	ND
星状神経節	-	-	-	+	-	ND	++	++	+	-	++	±	ND
肩甲上神経	ND	-	-	ND	-	-	+	+	-	-	+	ND	-
腕神経叢	-	-	-	ND	+	-	+	+	+	-	+	-	-
坐骨神経	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	-	-	-	±
脾臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
扁桃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
回腸	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
最長筋	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-
半腱様筋	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
副腎	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	±	-	-

++:PrP<sup>Sc</sup> 陽性、+:PrP<sup>Sc</sup> 陽性(<Mo Sc 1.6・g)、-:陰性、±:判定不能、ND:Not Done

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 福田茂夫、扇 勉：牛海綿状脳症 (BSE) プリオン脳内接種牛における異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) の分布. 2006 年プリオン研究会 (安比高原) 2006.9.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

## 12. プリオンの標的細胞特異性決定機構とプリオン蛋白質の細胞内分解に関する研究

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科 教授

研究協力者 瓜生匡秀、中満智史、黒川 彩 (北大大学院・獣医学研究科)

研究要旨 本研究ではプリオン持続感染細胞の PrP<sup>Sc</sup> の量的変動について詳細に検討した。プリオン持続感染マウス神経芽細胞 Neuro2a (ScN2a)を播種後、細胞当たりの proteinase K 抵抗性 PrP(PrP-res)量を調べたところ、PrP-res 量は経時的に増加していた。播種細胞数を変えて PrP-res の経時的な増加を検討した結果、培養時間ではなく、細胞が増殖して sub-confluent から confluent となる間に、PrP-res が増加することが判明した。この現象は使用した3種の N2a サブクローン(ScN2a-3, ScN2a-5, ScN2aII)で共通に認められた。継代直前に ScN2a に存在する PrP-res 量と比較して、継代24時間後で検出される PrP-res 量は著しく減少した。継代時の Trypsin 処理は、この PrP-res 量の減少には影響せず、細胞播種直後から24時間以内に PrP-res 量は急速に減少することが判明した。以上の結果から、プリオン持続感染細胞では、恒常的に一定量の PrP-res が産生されているのではなく、細胞密度にともなう細胞の生理状態の変化により、PrP-res 量の増減が繰り返されることが判明した。また、DNA マイクロアレイ法により、ScN2a-3 と非感染 N2a-3 の遺伝子発現を比較解析した。その結果、ScN2a-3 で非感染 N2a-3 より2倍以上発現が高い遺伝子を22遺伝子、ScN2a-3 で発現が1/2以下に低下した遺伝子を27遺伝子同定した。

### A. 研究目的

細胞におけるプリオンの増殖は、その主要構成要素である異常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) を指標に解析することが可能である。プリオン持続感染細胞は、プリオン感染性を有し、持続的に PrP<sup>Sc</sup> の指標となる proteinase K (PK) 抵抗性 PrP(PrP-res)を産生することから、PrP<sup>Sc</sup> の増殖機構の解析や、プリオン増殖阻害薬のスクリーニングなどに汎用されてきた。

プリオン持続感染細胞では PrP<sup>Sc</sup> は産生と分解の平衡状態にあると考えられる。PrP-res の有無を指標にプリオン感染の有無やプリオン増殖を評価する実験系であることから、感染細胞における PrP-res の動態を十分に理解しておく必要がある。

培養細胞における PrP<sup>Sc</sup> の増殖には、細胞膜表面に発現した成熟型 PrP<sup>C</sup> が必要である。また、脂質ラフトやエンドソームなどの酸性コンパートメントが、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> の会合および PrP<sup>Sc</sup> への構造転換の場と考えられている。しかし、これまでプリオン持続感染細胞における

PrP<sup>Sc</sup> の経時的な量的変動に関する報告はほとんどない。

そこで、本研究ではプリオン持続感染 Neuro2a マウス神経芽細胞を用いて、細胞内の PrP-res 量の経時変化を調べた。その結果、細胞の密度により細胞の PrP-res 量が大きく変動することを見出した。

### B. 研究方法

1) 細胞：マウス神経芽細胞 Neuro2a (N2a) をクローン化して得た、プリオン感受性サブクローンの N2a-3 および 5、および PrP<sup>C</sup> を過発現する N2a 細胞 (N2aII) を用いた。これらに Chandler 株が感染した持続感染細胞 (ScN2a-3, ScN2a-5 および ScN2aII) を使用した。

2) PrP-res の検出：細胞はセルスクレイパーで剥離し培地と共に回収した後、2,000 rpm、5分間遠心した。細胞の沈殿を PBS で洗浄した後、600  $\mu$ l の lysis buffer (0.5% Triton-X 100, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM Tris-HCl pH

7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA)を加えて懸濁し、4°C、20分間溶解した。2,000 rpm、5分間の遠心後、上清を回収し蛋白濃度測定、PrP-res および total PrP の検出に用いた。蛋白濃度は DC protein assay (Bio-Rad)を使用して測定した。Total PrP 検出用サンプルには等量の 2x sample buffer を加え、5分間煮沸した後、氷中で急冷した。PrP-res 検出用サンプル 300  $\mu$ l に、1 mg/ml PK を 6  $\mu$ l を加え、37°C で 20分間処理した。PK による消化を停止するために、0.1 M Pefabloc (Roche)を 5  $\mu$ l を加え、4°C、20分間静置した。続いて、10 mg/ml DNase I (Roche)を 1.5  $\mu$ l を加え、室温で 15分間静置した。次に、4%リンタングステン酸を終濃度 0.3%となるよう試料に加えて室温で 20分間攪拌し、15,000 rpm、4°C、20分間遠心した。上清を除去し、沈殿に 2x sample buffer を加えて超音波破碎し、5分間の煮沸後、氷中で急冷した。Total PrP および PrP-res はウエスタンブロット(WB)により検出した。検出には LAS-3000 を使用し、定量解析を行なった。

3) DNA マイクロアレイ解析:細胞から Torizlo 試薬 (Invitrogen) により totalRNA を回収し、One-cycle IVT Labeling Kit (Affimetrix) にて biotin 化標識 cRNA を作製した。DNA マイクロアレイ解析は、GeneChip system により行なった。DNA マイクロアレイチップは mouse 430 2.0 (Affimetrix) を用いた。データは、GCOS (Affimetrix) および Ingenuity Pathway Analysis を用いて解析した。

4) 定量 RT-PCR: 個々の遺伝子発現の定量解析は定量 RT-PCR により行なった。Total RNA から First Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare) を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、TaqMan probe および TaqMan Master Mix からなる反応液を作製して、ABI7900 リアルタイム PCR 装置を用いて、定量解析を行なった。TaqMan probe は Gene Expression Analysis (Applied Biosystem) のライブラリーより購入した。内在性マーカーとして GAPDH を使用した。まず、標準曲線法により標的遺伝子の増幅を確認し、その後  $\Delta\Delta C_T$  法により遺伝子発現の比較定量解析を実施した。

## C. 研究結果

図 1a に ScN2a-5 の密度および形態を示した。ScN2a-5 を 1:10 で播種した場合、3 日目には sub-confluent、4 日目には confluent の状態となった。また、1:20 では 5 日目、1:40 では 6 日目におよそ confluent になった (結果は示さず)。

図 1b-d に ScN2a-5 における total PrP および PrP-res 量の経時変化を示した。1:10 で播種した場合、WB により検出される PrP-res 量は 3 日目以降顕著に増加した (図 1b)。試料の蛋白当量を揃えて電気泳動していることから、PrP-res 量の増加は細胞当たりの PrP-res 量の増加を示している。WB の結果を定量解析して、蛋白当量当たりの PrP-res 量の変化をグラフに示した。播種後 1~4 日目の 72 時間の間に PrP-res の量は 10 倍に増加した。1:20 で播種した場合は播種後 1~5 日目の 96 時間の間に PrP<sup>Sc</sup> の量は 5.6 倍に増加した。特に、3~5 日目の 48 時間の間に PrP<sup>Sc</sup> 量が 3.8 倍に増加した (図 1c)。また、1:40 では 2~6 日の 96 時間の間に PrP-res の量は 23 倍に増加した。特に 4~6 日目の 48 時間の間に 10 倍程度増加した (図 1d)。従って、ScN2a-5 は細胞が sub-confluent から confluent となる間に PrP<sup>Sc</sup> が顕著に増加したことが判明した。つまり、ある程度の細胞密度以上になると細胞内の PrP-res が増加することが示唆された。また、total PrP 量はいずれの割合で播種した場合でも、PrP-res と同様な増加傾向を示した (図 1b-d)。

ScN2a-5 の PrP-res 量は培養時間とともに増加することが判明したが、その要因として個々の細胞内 PrP-res 量が増加する可能性、あるいは PrP<sup>Sc</sup> を有する細胞が増加する可能性が考えられた。この点を確認するため、セルブロットによって ScN2a-5 における PrP-res 量の経時変化を調べた。図 2 に示したように、セルブロットでは全体に PrP-res 陽性領域が濃くなったことから、PrP-res 陽性の細胞数が増加したのではなく、個々の細胞内の PrP-res 量が時間とともに増加したことが確かめられた。

ScN2a-5 では細胞密度の増加に伴い PrP-res 量が増加することが判明した。そこで、他の N2a サブクローンである ScN2a-3 および ScN2aII における PrP 量の経時変化についても検討したところ、ScN2a-5 と同様に、細胞が sub-confluent から confluent となる間に PrP-res が顕著に増加した (結果は示さず)。

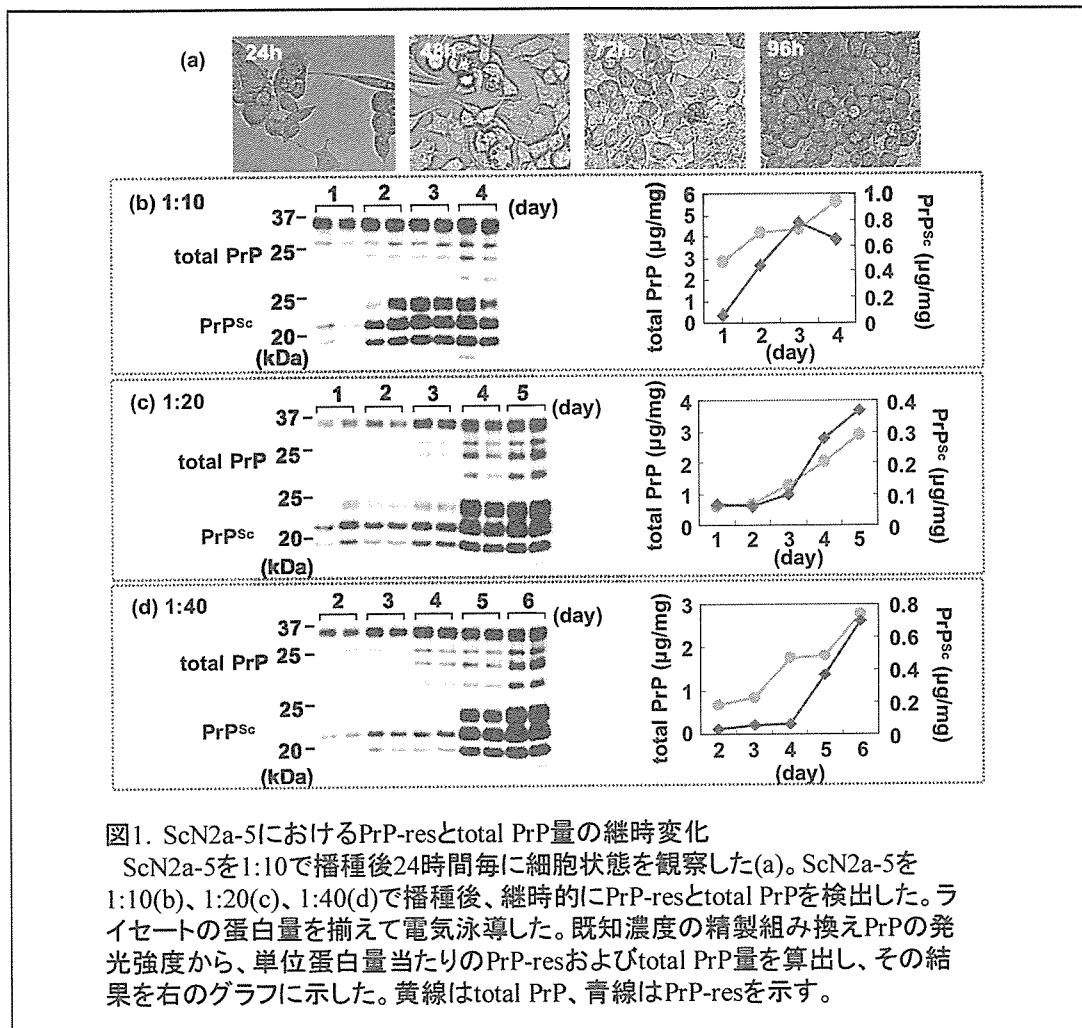


図1. ScN2a-5におけるPrP-resとtotal PrP量の経時変化

ScN2a-5を1:10で播種後24時間毎に細胞状態を観察した(a)。ScN2a-5を1:10(b)、1:20(c)、1:40(d)で播種後、経時的にPrP-resとtotal PrPを検出した。ライゼートの蛋白量を揃えて電気泳動した。既知濃度の精製組み換えPrPの発光強度から、単位蛋白量当たりのPrP-resおよびtotal PrP量を算出し、その結果を右のグラフに示した。黄線はtotal PrP、青線はPrP-resを示す。

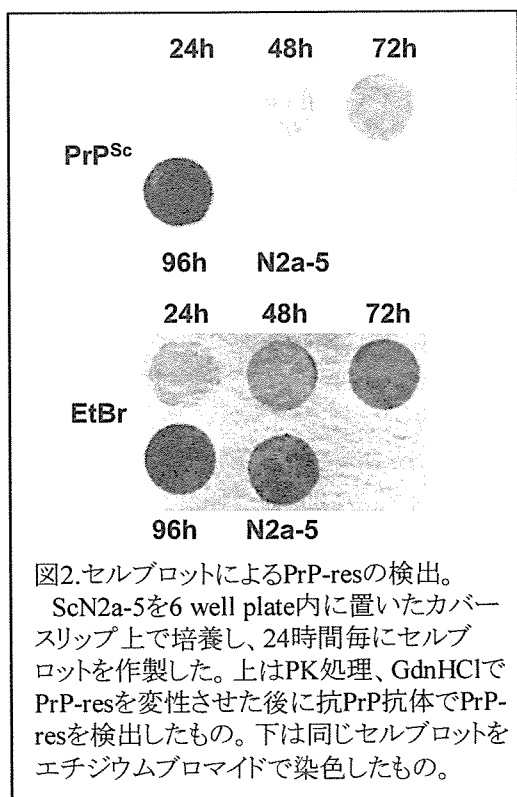


図2. セルブロットによるPrP-resの検出。

ScN2a-5を6 well plate内に置いたカバースリップ上で培養し、24時間毎にセルブロットを作製した。上はPK処理、GdnHClでPrP-resを変性させた後に抗PrP抗体でPrP-resを検出したもの。下は同じセルブロットをエチジウムブロマイドで染色したもの。

細胞播種 24 時間後では検出された PrP-res 量が予想よりも少なかった。例えば、ScN2a-5 を 1:10 で播種した場合、播種 24 時間後の PrP-res 量は、通常継代を行なう播種 72 時間後の PrP-res 量の約 1/12 であった (図 1b)。このことは、継代後の最初の 24 時間で PrP-res 量が減少する可能性を示している。細胞継代時には Trypsin 処理により細胞を剥がしている。そこで、試料調整時の Trypsin 処理による PrP<sup>Sc</sup> の減少を検討したが、Trypsin 処理は PrP<sup>Sc</sup> 減少の主要因ではなかった (結果は示さず)。そこで、ScN2aII を用いて、播種後 24 時間までの PrP 量の変化を調べた。PrP-res 量は時間とともに減少し、播種後 4~24 時間の間で、約 1/11 にまで減少した (図 3)。従って、継代後 24 時間の間に細胞内 PrP<sup>Sc</sup> 量は急速に減少し、その後細胞密度が増加するとともに PrP<sup>Sc</sup> 量が増加することが示唆された。一方、total PrP は播種後 4~24 時間で 5.3 倍に増加した。この total PrP