

200837045A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

# 食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

# 食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 20 年度食品の安心・安全確保推進研究事業  
「食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究」  
班 員 名 簿

氏 名	所 属	職 名
佐多徹太郎	国立感染症研究所 感染病理部	部 長
福田 茂夫	北海道立畜産試験場 基盤研究部遺伝子工学科	研究職員
古岡 秀文	国立大学法人帯広畜産大学 畜産学部	教 授
寺尾 恵治	独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター	特別研究員
石黒 直隆	岐阜大学 応用生物科学部	教 授
萩原 健一	国立感染症研究所 細胞化学部	室 長
北本 哲之	東北大学医学系研究科 創生応用医学研究センター	教 授
横山 隆	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所	研究チーム長
村山 裕一	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所	上席研究員
新 竜一郎	長崎大学 医歯薬学総合研究科	助 教
山河 芳夫	国立感染症研究所 細胞化学部	再任用職員
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科	教 授
堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科	教 授



9. 食肉検査における高感度検査法の開発	45
研究分担者：新 竜一郎 (長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科)	
10. プリオンの細胞および組織における病理学的研究	47
研究分担者：佐多 徹太郎 (国立感染症研究所・感染病理部)	
11. プリオン病の病態解析とマーカートンパクに関わる研究	53
研究分担者：山河 芳夫 (国立感染症研究所・細胞化学部)	
12. トランスクリプトームによるプリオン病の病態解析	57
研究分担者：堀内 基広 (北海道大学大学院・獣医学研究科)	
13. プリオン蛋白構造変換機序の解析	61
研究分担者：堂浦 克美 (東北大学大学院・医学系研究科)	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	65

# I. 総括研究報告書



## 総括研究報告書

研究代表者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 これまで BSE 摘発を目的とした検査法の迅速化と高度化、プリオン遺伝子組換えマウス、本邦 BSE の病態解析、そしてマウス、ウシ、サル等への伝達試験と継代試験ならびにプリオンの株化を行ってきた。これらの研究実績を踏まえ、本研究班では、1) 定型および非定型 BSE に係わる感染発症機序の解明、2) 「種の壁」のメカニズムの解明、3) 食肉検査における高感度検出法の開発、4) 食用となるシカの CWD リスク評価、を中心として研究を行う。非定型 BSE の伝達試験では牛遺伝子組み換えマウスで発症したが、近交系マウスでは発症せず、定型 BSE と性状が異なっていた。定型 BSE プリオンのモルモットへの伝達試験でヒト sCJD に類似する病変が得られ、また脳内接種サルが 3 頭とも発症し、vCJD に類似する病理所見をえた。ヒト型プリオン蛋白を導入したノックインマウスを用いた vCJD プリオンの感染実験が順調に進んだ。In vitro の実験では、PrPSc の取り込み及び感染成立に関与する生体側因子の同定、プリオンの産生に影響する宿主因子の発見、スクレイピー由来のマウスプリオン接種マウスの延髄前庭核付近における宿主遺伝子発現変化として、ケモカインの発現が有意であったことなどの成果が得られた。種々の研究は継続して行われているので、来年度には多くの研究成果が期待される。

研究分担者（計 12 名）：

福田茂夫（北海道立畜産試験場基盤研究部遺伝子工学科・研究職員）

石黒直隆（岐阜大学応用生物学部・獣医公衆衛生学・教授）

萩原健一（国立感染症研究所細胞化学部・室長）  
堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科・プリオン病学教室・教授）

堂浦克美（東北大学大学院・プリオン病学・教授）

山河芳夫（国立感染症研究所 細胞化学部・再任用職員）

古岡秀文（国立大学法人帯広畜産大学畜産学部・獣医病理学・教授）

横山 隆（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所プリオン病研究センター・研究チーム長）

寺尾恵治（独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・特別研究員）

北本哲之（東北大学医学系研究科創生応用医学研究センター・教授）

村山裕一（独立行政法人農業・食品産業技術総

合研究機構・動物衛生研究所・上席研究員）

新竜一郎（長崎大学医歯薬学総合研究科・助教）

### A. 研究目的

牛海綿状脳症（BSE）プリオンが食品を介して変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）を引き起こすことは周知の事実となったが、プリオン病の本態のみならず、そのリスク解明には不明な点が多い。またウシの BSE や BSE 由来のヒト vCJD の感染発症機序についても、種々のデータが蓄積されてきたものの、解明すべき点が多い。

英国での最初の BSE 発生以来約 15 年を経て 2001 年 9 月にわが国でも BSE 例が発見された。以来、食用ウシのプリオン検査、いわゆる全頭検査が開始され、死亡牛検査も加わって、現在までに 36 頭の BSE 罹患ウシが摘発された。ELISA 法によるスクリーニング検査とウエスタンブロット法および病理・免疫組織化学法による確認検査によって、定型的 BSE 例のほか、21 ヶ月の若齢 BSE、23 ヶ月および 169 ヶ月令の非定型 BSE 例など、世界で報告されているものと同様な BSE 例がわが国でも発見された。また BSE ウシから食肉を介して感染発症する

vCJD 例は英国を中心として全世界で 200 例を越え、2005 年にはわが国でも 1 例が発見されている。

これまでスクリーニングや確認検査法の高感度化と特異性や迅速性を計り、新たな検査法の開発や遺伝子組換えマウスの作製、わが国で摘発された BSE ウシのプリオン体内分布を明らかにし、また定型および非定型 BSE プリオンのマウスやウシそしてサルへの脳内接種や経口による伝達試験を実施して BSE プリオンの性状や動物における体内分布を明らかにしつつ、研究資源を蓄積してきた。伝達試験には通常 2 年以上かかり、経口感染例はウシでの発症がみられたが、サルではいまだ経過観察中である。

一方で vCJD 患者の血液や血液製剤等からヒトへの感染事例が報告され、プリオン遺伝子型による感受性の違いも明らかになってきている。ウシでの BSE 感染発症機序のみならず、食品、輸血、血液製剤そして臓器移植等の高度先進医療を介した vCJD リスクにも関心が高まってきている。

そこで、これまで開発してきたツールや蓄積してきた研究資源を有効活用しつつ、新しい高感度検出法、BSE 感染発症機序の解明、病態や病態マーカーの解析、プリオン構造変換機序やそれに関わる宿主因子の解明、定型 BSE を対照とした非定型 BSE の性状解析、そして「種の壁」の解析を通して、ヒトへのリスク解明を目的として研究を行う。これらにより、食品の BSE リスクを低減させ、非定型 BSE の科学的リスク評価によるリスク管理への根拠の提示、さらにプリオン病態に影響する因子の検索同定により、プリオン病に係わる厚生労働行政に広く貢献できると考える。

## B. 研究方法

### 1) 定型および非定型 BSE に係わる感染発症機序の解明

(1) 動物を用いた in vivo 研究では、定型および非定型 BSE プリオンを実験感染させたウシで、病態とプリオンの性状および体内分布を検討し、発症機序を解明する。生前の髄液、血液等および剖検後の組織からプリオンの検出を試み、同時に研究資源化し研究班の研究に役立てる(福田)。プリオン感染マウス脳サイトカインプロファイリングと各種サイトカインノックアウトマウスあるいはモルモットに感染させて病態解析を行う(古岡)。非定型 BSE プリオンを 3 種の近交系マウスで伝達試験お

よび継代試験を行い、生化学および病理解析を進める(萩原)。BSE プリオンの生体への侵入および神経系への伝播経路は不明である。ウシやヒツジの小腸ルーブ内にプリオンを接種し、プリオンの取り込みに関与する免疫系細胞群およびプリオンの局在を検討する(石黒)。

(2) プリオン感染細胞や組織等を用いた in vitro 研究では、プリオンの細胞内取込みに係わる候補分子をはじめ同定できたので、培養細胞系での挙動およびプリオン感染組織での分布を検討する(佐多)。いままでのマウス、ウシ、サルの経時的な研究資源(髄液や血液等)を活用しプリオンの蓄積に伴って変化するタンパク質のプロファイリング(プロテオーム解析)を 2D-LC/MS/MS 法で行い、病態マーカーとなる分子を条件や対象を変えて検索する(山河)。国内 BSE プリオンのマウス馴化株はスクレイピーと異なる生化学的性状および病変分布を示すので、特定部位の脳内宿主細胞の応答を網羅的遺伝子発現で解析(トランスクリプトーム解析)を行う(堀内)。プリオン複製に関与する因子について持続感染細胞を用いて多角的に検討する(堂浦)。

### 2) 種の壁のメカニズムの解明

動物への伝達試験により解析するので研究期間として 3 年間を要す。非定型 BSE プリオンを各種 Tg マウス—ウシやマウスの脳内に接種し生化学的および生物学的性状を解析する(横山)。全種類のヒト型プリオン遺伝子多型をノックインしたマウスを作製し実験に必要な数を準備し、定型および非定型 BSE プリオンの感染実験を行う(北本)。カニクイサルはプリオン感受性の遺伝子多型をもち、脳内接種したサルがすでに発症した。サル脳馴化 BSE プリオンの継代、経口接種および輸血サルを用いて定期的に臨床症状、各種の検査、神経障害等を検討し、髄液や血液、剖検組織を用いて性状を明らかにし研究資源化するとともに、種の壁のメカニズムを検討する(寺尾、山河、佐多)。

### 3) 食肉検査における高感度検出法の開発

プリオンを試験管内で増幅する PMCA 法の原理にもとづいて、非定型 BSE プリオンを中心として至適増幅条件を検討する。非定型 BSE



やサル脳由来プリオンから超高感度検出法を開発する(村山)。また PMCA 法とは異なり、リコンビナント PrP を使い攪拌装置で断片化し増幅する QUIC 法を BSE プリオンの高感度検出法に応用する(新)。

#### 4) 食用となるシカの CWD リスク評価

CWD は自然状態でシカ間に容易に感染が成立するので、海外からの侵入防止および国内サーベイランスは継続的に行う必要がある。北海道のエゾシカを対象とし、プリオンの存在の有無とともに感受性を規定する PrP 遺伝子についても解析する(堀内)。

#### (倫理面への配慮)

本研究ではヒトを対象としない。プリオンの取扱いについては各施設のバイオセーフティやバイオリスク管理規則にもとづいて行う。動物実験に当たっては所属施設における動物実験取扱規程等に則り、動物愛護および管理に関する法律や実験動物の飼養及び保管に関する基準を遵守し、動物福祉や倫理を踏まえ、動物実験委員会に申請し承認を得てから実施する。

### C. 研究結果

#### 1) 定型および非定型 BSE に係わる感染発症機序の解明

黒毛和種雌 2 頭およびホルスタイン雌 3 頭に非定型 BSE(BSE/JP24)と定型 BSE (BSE/UK) を脳内接種した。対照として黒毛和種とホルスタイン各 1 頭に BSE 陰性脳乳剤を接種した。現時点の 75-118 日後までには臨床所見はない。平成 19 年度に定型 BSE を脳内接種した 5 頭について 485-531 日後に動物衛生研究所 P3 実験室で剖検した。脳幹を中心にプリオンが沈着し、大脳におけるプリオンの分布に若干の違いを認めた(福田)。BSE プリオン接種モルモットはマウスと異なり潜伏期間の変化は乏しく、比較的早期の 300 日前後に発症するので、感受性が高い。小脳皮質萎縮を来す病変が特徴的で、小脳顆粒細胞の脱落、プルキンエ細胞神経突起の変性をともなっていた。ヒトの sCJD と類似する病変であった(古岡)。非定型 BSE と定型 BSE を比較する目的で近交系マウスへの伝達実験を行った。定型 BSE を接種した C57BL/6J、SJL、RIII マウスは、接種後 250 日目以降に運動失調などの神経症状を呈する個体が出現した。また、採材した組織には PrPSc

の蓄積が検出された。一方、非定型 BSE プリオンを接種したマウスは、長期間の経過観察を行ったが PrPSc の明らかな蓄積は検出されず、脳組織の変性も認められなかった(萩原)。免疫系細胞から神経系細胞へのプリオンの伝達機構を培養細胞で検討したが、伝達と増殖は必ずしも一致しなかった。高齢牛と若齢牛の PrPC の比較では、プロテオソーム活性は高齢牛で極端に低かった(石黒)。PrPSc に対し高感受性を有する細胞株と非感受性細胞株を用いた比較検討から、PrPSc の取り込み及び感染成立に関与する生体側因子の同定を進め、同定した分子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成した(佐多)。BSE プリオンを接種したカニクイザルの体液(血液、脳脊髄液及び尿)中のタンパク質を網羅的に解析し同定し、vCJD/プリオン病の指標となるマーカータンパクを検索・同定あるいは分子病態解析を行う為に必要な技術の検討を行なった(山河)。スクレイパー由来のマウスプリオン接種マウスの延髄前庭核付近における宿主遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ法で検討した。ミクログリアで発現する遺伝子群を選択したところ、モノサイト・マクロファージの活性化マーカーとなるケモカイン等の発現が有意であった。Cdl4 分子は病気の進行に促進的に、Cxc110 分子は潜伏期間が延長する働きがあることがわかった(堀内)。プリオンの産生に影響する宿主因子として Gabrb1 を発見した。GABAA 受容体と関係しない別の機能がプリオン産生に関与していることが示唆された(堂浦)。

#### 2) 種の壁のメカニズムの解明

わが国の非定型 BSE 症例(BSE/JP24)を牛型遺伝子組み換えマウス(TgBoPrP)へ伝達を行った。TgBoPrP での潜伏期は 223.5 日であり、定型 BSE に比べて短かった。TgBoPrP の脳内に蓄積した異常プリオン蛋白質(PrPSc)の性状は定型 BSE 由来の PrPSc とは異なっており、脳内での病変分布、PrPSc の蓄積も C-BSE とは異なっていた(横山)。ヒト型プリオン蛋白を導入したノックインマウスを用いて vCJD プリオンの感染実験を行った。ヘテロの Hu129M/V マウスは、ヘミの Hu129M/0 と比べて、そして Hu219E/K マウスはホモの Hu219E/E や HuPrP219K/K と比べて明らかに異常型プリオン蛋白の沈着量が少ないことが明らかとなった。stone fence model(石垣モデル)を記載した(北本)。BSE/JP8Wakayama を脳内接種したカニクイザル 3 頭すべてが発症した。潜伏期間は 2.3 年、2.3 年そして 3.7 年で安楽死させた。振

戦、驚愕反応、失調、記憶能低下、運動機能障害があり、起立不能となった(寺尾)。

### 3) 食肉検査における高感度検出法の開発

非定型 BSE PrPSc の高効率試験管内増幅法を開発することを目的とし、PMCA 増幅を検討したが、定型 BSE 増幅条件下では、非定型 BSE PrPSc の増幅はほとんど認められなかった(村山)。アミロイド線維の検出試薬として用いられる ThT 試薬と攪拌装置付の蛍光プレートリーダーを組み合わせるにより、ほぼ real time に recombinant PrP fibril の増幅過程が測定可能なアッセイ系を開発することに成功した (Real-time QUIC) (新)。

### 4) 食用となるシカの CWD リスク評価

北海道でと畜されるシカについてサーベイランスを実施している。成果は次回まとめて報告する。

## D. 考 察

定型および非定型 BSE の性状解析として、マウスや牛、そしてサル等への伝達試験が順調に進んできた。いまだ不十分ではあるが、その両者の違いがあきらかにされつつある。牛への伝達性は高いが異種動物への伝達性は低い。今後接種動物が発症してくるので、さらにその性状が明かにされるであろう。定型 BSE を脳内接種したサルが長年かかって発症し、その病態は3頭とも類似していた。ヒト vCJD のモデルになることを期待したい。また、おそらく来年度には発症が期待される経口感染や継代実験、非定型 BSE のサルへの接種実験の結果が楽しみである。PMCA 法はこれまでの高感度検出法よりもさらに高感度が期待でき、生前診断法として期待されている。ただし、BSE プリオン増殖の報告は世界的にもまだない。高感度でなくても増幅可能となったので、近い将来には増幅可能となるであろう。そのときに高感度故に非特異反応との鑑別法の確立も同時に期待したい。

## E. 結 論

非定型 BSE は、定型 BSE と性状が異なっていた。定型 BSE プリオンのモルモットへの伝達試験が成功し、また脳内接種サルが3頭とも発症した。ヒト型プリオン蛋白を導入したノックインマウスを用いた vCJD プリオンの感染実験が順調に進んだ。In vitro の実験では、PrPSc

の取り込み及び感染成立に関与する生体側因子の同定、プリオンの産生に影響する宿主因子の発見、スクレイピー由来のマウスプリオン接種マウスの延髄前庭核付近における宿主遺伝子発現変化として、ケモカインの発現が有意であったことなどの成果が得られた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

各研究分担者の報告書参照。

### 2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照。

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

登録なし

### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告書



# 1. 定型および非定型 BSE 感染牛のプリオン体内分布と病態の解析

研究分担者 福田茂夫 北海道立畜産試験場 基盤研究部  
研究協力者 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 本課題は、定型および非定型 BSE プリオン感染実験牛を作出し、BSE プリオンの病原性およびプリオン体内分布を明らかにする。本年度は、黒毛和種雌 2 頭とホルスタイン種雌 4 頭に定型および非定型 BSE プリオン感染脳乳剤を接種し、BSE プリオン感染実験牛を作出した。現在、定期的な臨床症状の観察、血液等の採取を継続している。また、定型 BSE プリオン感染実験牛について、接種後 524 日経過し臨床上的変化があった 1 頭と明瞭な BSE の臨床所見はみられなかった接種後 485 日および 531 日経過した 3 頭を病理解剖し、定型 BSE の PrP<sup>Sc</sup> 含む脳組織を研究資源として確保した。

## A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は、牛におけるプリオン病であり、定型 BSE プリオン単一の病原体に起因すると考えられてきたが、近年ヨーロッパ各国および米国において従来の BSE と性状の異なる「非定型 BSE」プリオンが 30 例以上報告されている。定型 BSE との分子量の比較から H 型と L 型が存在し、ほとんどが高齢牛から発見されているなどの特徴がある。国内においては、これまでに 35 例の BSE 患者が BSE スクリーニング検査および死亡牛検査で発見されているが、第 8 例目および第 24 例目の BSE 患者が非定型 BSE であることが報告されている。これらの非定型 BSE については、感染経路や病態について明らかでなく、欧米における非定型 BSE との関連も不明である。人のクロイツフェルト・ヤコブ病にみられる原因不明の弧発性である可能性もあり、その発生機序や病態、感染性を明らかにする必要がある。

我が国の BSE 患者においては、黒毛和種における BSE も 35 例中 4 例報告され、うち 1 例は非定型 BSE であった。黒毛和種は我が国固有の品種であり、プリオン感染における病態は不明である。乳用ホルスタイン種に比較し、黒

毛和種繁殖用雌の飼養期間は長く、高齢牛で発生している非定型 BSE との関連は重要な課題である。

本研究では、定型および非定型 BSE プリオン感染実験牛を作出し、BSE プリオンの病原性および体内分布を明らかにする。また黒毛和種を用いることにより、黒毛和種における BSE の病態とプリオン体内分布について検討する。

本年度は BSE プリオン感染牛の作出し、経過観察および血液等生体材料を採取する。またこれまでに作出した定型 BSE 感染実験牛の病理解剖をおこない、BSE プリオン脳内分布を分析し、脳組織などの研究資源を確保する。

## B. 研究方法

北海道十勝管内の BSE 非発生農場より黒毛和種雌 3 頭とホルスタイン種雌 5 頭を導入した。BSE 感染実験室 (動物バイオセーフティー基準 (ABSL) 2) にて、非定型 BSE (BSE/JP24: 国立感染症研究所より分与) および定型 BSE (BSE/UK: 動物衛生研究所より分与)、それぞれ 10% BSE 感染脳乳剤 1ml を脳内接種し、BSE プリオン感染実験牛とした。BSE プリオン感染実験牛をフリーバーン方式専用隔離牛舎



(ABSL1)にて飼養した。定期的に臨床症状を観察するとともに、接種前、接種後 1、3、6 ヶ月に血液および尿を採取した。

また、平成 19 年度に定型 BSE プリオン脳内接種した牛 5 頭について、病理解剖を行い、BSE プリオンの脳内分布および研究資源の収集をおこなった。

BSE プリオン感染実験牛は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。病理解剖時に中枢神経組織および血液、脳脊髄液を採取した。採取した組織は、生化学検査用に $-80^{\circ}\text{C}$ 、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。

各 BSE 脳内感染実験牛から採取した脳組織の 18 カ所より PrP<sup>Sc</sup> の検出をウエスタンブロット法で行った (図 1)。1 レーン 5mg 脳組織等量とし、検出は HRP 標識 T2-mAb (5000 倍希釈)、化学発光試薬 SuperSignal West Dura (PIERCE) および Alpha Ease Fc を用いた。

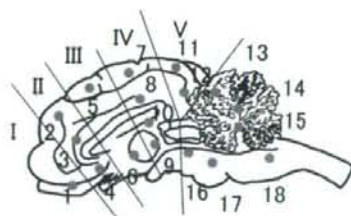


図 1 脳組織の採材部位

脳 I : 1 嗅脚、脳 II : 2 上部、3 髄質、4 線条体、脳 III : 5 頭頂部、6 視床、脳 IV : 7 頭頂部、8 髄質、9 視床、10 海馬、脳 V : 11 後頭部上部、12 後頭部下部、小脳 : 13 皮質、14 白質、15、小脳脚、脳幹部 : 16 中脳、17 橋、18 延髄門部

#### (倫理面への配慮)

サンプル採取および分析、動物の剖検は、プリオン感染を前提として実施し、研究従事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

黒毛和種雌 2 頭とホルスタイン種雌 3 頭に非定型 BSE (BSE/JP24) 脳乳剤、ホルスタイン種 1 頭に定型 BSE (BSE/UK) を接種し、BSE プリオン感染実験牛を作出した (表 1)。対照として黒毛和種雌 1 頭とホルスタイン種雌 1 頭に BSE 陰性を確認した牛脳乳剤を接種した。BSE プリオン感染実験牛は、平成 20 年 12 月 31 日現在において、臨床上的異常所見はない。

表 1 BSE プリオン感染実験牛の経過

No	品種	接種材料	接種 日齢	状態 (12月末)
476-8	Hols	BSE/JP24	75	著変なし
565-2	Hols	BSE/JP24	84	著変なし
094-7	Hols	BSE/UK	102	著変なし
079-1	Hols	BSE/JP24	81	著変なし
562-1	Hols	BSE 陰性	85	著変なし
604-8	JB	BSE/JP24	118	著変なし
607-9	JB	BSE/JP24	116	著変なし
596-6	JB	BSE 陰性	120	著変なし

Hols : ホルスタイン種、JB : 黒毛和種

本年度解剖した定型 BSE プリオン感染実験牛について、接種後 524 日経過した 1 頭に神経質になる臨床上的変化があったが、他の 3 頭では明瞭な BSE の臨床所見はみられなかった (表 2)。ウエスタンブロット法による PrP<sup>Sc</sup> 検出では、BSE プリオン感染脳乳剤を接種した 4 頭でそれぞれ PrP<sup>Sc</sup> を検出した。各実験牛それぞれ脳幹部を中心に PrP<sup>Sc</sup> の蓄積がみられ、接種後 485 日と 524 日以上では大脳における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積に差が見られた (図 2)。

表 2 本年度解剖した BSE プリオン感染実験牛の経過と状態

No	接種材料	解剖後経過日数	状態
400-0	BSE/UK	524	神経質
191-2	BSE/UK	485	著変なし
662-7	BSE/UK	485	著変なし
900-7	BSE/UK	531	著変なし
401-7	BSE 陰性	524	著変なし

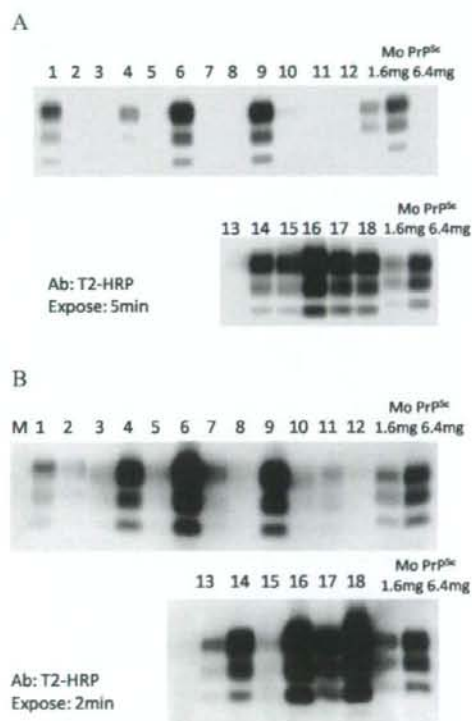


図 2 脳組織の PrP<sup>Sc</sup> 分布

A: No. 191-2 (接種後 485 日)、B: No. 400-0 (接種後 524 日)

脳 I: 1 嗅脚、脳 II: 2 上部、3 髄質、4 線条体、脳 III: 5 頭頂部、6 視床、脳 IV: 7 頭頂部、8 髄質、9 視床、10 海馬、脳 V: 11 後頭部上部、12 後頭部下部、小脳: 13 皮質、14 白質、15、小脳脚、脳幹部: 16 中脳、17 橋、18 延髄門部

#### D. 考察

黒毛和種への非定型 BSE プリオン接種では接種後 220 日経過した段階(平成 20 年 12 月末)では臨床上の著変はなく、さらに観察が必要である。これまでに脳内接種による定型 BSE プリオン感染実験牛の血液では、異常所見はみられなかったが、非定型 BSE における血液性状は解明されておらず、次年度以降に分析する予定である。また生体から採取できる脳脊髄液の分析による BSE の病態解析も必要である。

定型 BSE プリオン感染実験牛の脳内における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積に差が見られ、接種 500 日前後における PrP<sup>Sc</sup> 脳内分布の動向が明らかとなった。

#### E. 結論

黒毛和種への脳内接種による非定型 BSE プリオン感染実験牛はさらに観察が必要である。ウエスタンブロット法により脳内の PrP<sup>Sc</sup> 分布に差のある脳内接種 485 日および 524 日以上経過した脳組織を研究資源として確保した。

#### 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

福田茂夫他「BSE 脳内接種牛の網膜における異常プリオン蛋白質の蓄積量」 2008 年プリオン研究会、北海道新得町、2008 年 8 月 29-30 日。

#### 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
3. その他



## 2. プリオン感染脳内の免疫学的解析および 非定型 BSE の性状解析 —BSE 伝達モルモット小脳の病理—

研究分担者 古岡 秀文 帯広畜産大学 基礎獣医学部門  
研究協力者 堀内 基広 (北海道大学大学院・獣医学研究科)  
山河 芳夫 (国立感染症研究所・細胞化学部)  
佐多 徹太郎 (国立感染症研究所・感染病理部)

**研究要旨** これまでに種々の実験動物に対して伝達性と、いわゆる BSE 表現型実験動物の探索を目的として、BSE プリオンの伝達試験を実施してきた。その中で BSE プリオンをモルモットに伝達すると顕著な小脳皮質萎縮を示す特徴的な病変がみられることをみいだした。この病変は継代によっても受け継がれたが、このような病態は実験の伝達を含めてこれまで動物プリオン病では報告がない。この小脳病変は孤発性 CJD (sCJD) にみられる小脳病変に極めて類似していることから、sCJD のモデル系として病理発生機序を明らかにすることは比較病理学的にも意義あることと考えられた。そこで、モルモットの小脳病変について、プリオンの蓄積様式、蓄積に伴うプルキンエ細胞や顆粒細胞の神経突起の変化について病理学的に解析を行った。その結果プリオンの蓄積に伴い顆粒細胞の軸索変性がみられ、最終的には顆粒細胞の脱落が生じる。また、プルキンエ細胞の樹状突起や軸索腫大についてもプリオンの蓄積が強く関わっていることが明らかになった。この病態はモルモット固有種に限定した種特異的なものである可能性は否定できないが、新たに付け加えられるべき BSE プリオンの生物学的性状の一つと考えられた。

### A. 研究目的

BSE やスクレイピーといった動物プリオン病では病理学的にアストログリアの活性化やミクログリアの増生を伴う空胞形成を特徴とする。野外発生例では脳内侵入門戸である脳幹部を中心にこれら病変が強くみられるが、病変は同質である。また、BSE プリオンやスクレイピープリオンを種々の動物種に伝達した際に見られる病変も稀にアミロイドプラークを伴うが、多くの場合同質の病変が再現され、これら病変以外に観察されている特徴的な病態についての文献的な記載はない。

これまで種々の実験動物における伝達性と、リンパ系組織にプリオンの蓄積がみられない、いわゆる BSE 表現型実験動物の探索を目的として、BSE プリオンの伝達試験を実施してきた。BSE 表現型実験動物はみいだされなかったが、対照スクレイピー株との比較の中で、それぞれの動物種に対する伝達性、発症経過や病変の分布が異なり、BSE プリオンの生物学的性状の一端が明らかになった。

これら一連の研究により BSE 接種モルモットは比較的早期の発症を示し、感受性が高いことがわかった。加えて、感染モルモット小脳にはこれまで動物プリオン病では報告されていない新たな病態がみいだされ、そしてそれは sCJD にみられる小脳病変に類似していた。

そこで本研究では、BSE プリオンの生物学的性状の一端を明らかにすることを目的として、この病態を病理学的に解析した。特に、この感染モルモット小脳病変は sCJD 病変の病理発生を考察する上からも興味深いモデルであり、人医学への貢献という点からも、BSE プリオンに関わる本病変病理発生機序について明らかにすることは意義あることと考えられた。

### B. 研究方法

と畜場で摘発された BSE (KUS) の 10% 脳乳剤をマウス (ICR、クレア、♀、4 週齢)、およびモルモット (Hartley、SLC、♀、3 週齢) に脳内接種を行い、これらを初代動物とした (表 1)。これら動物が臨床症状を示し、かつ終末期に至るか、

あるいは神経症状を有さないが、衰弱するまで観察を行い、解剖を行った。これら発症動物の一部については脳組織より脳乳剤を作製し、継代を行い二代目、さらに三代目動物とした。

病理学的解析のために、ホルマリン固定後、99%蟻酸処理1時間後、通常の方法によりパラフィン包埋し、薄切標本を作製した。標本は脱パラフィン後、HE染色、LFB-HE染色、Bielschowsky染色変法を実施した。また、135°Cオートクレーブ20分(135DWHA法)の前処理後、抗プリオン抗体として110抗体を用いて免疫組織化学的染色(IHC法)を実施した。加えて、それぞれの抗原賦活化法実施後、抗Synaptophysin抗体、抗MAP2抗体、抗Calbindine抗体によるIHC法を実施した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

BSEプリオンのマウス、モルモットへの伝達試験結果は表1にまとめた。BSE接種マウスでは初代では終末期まで450日程度必要であったが、二代目、三代目では170日程度の短縮がみられた。一方、モルモット初代の終末期までは約360日、二代目、三代目はともに終末期まで300日程度を要した。

病理学的にBSE接種モルモットでは視床や小脳髄質および脳幹部を中心に瀰漫性からグリアタイプに分類される放射状のプリオンの蓄積がみられた。これら病変に加え、小脳に特徴的な病変が観察された。対照動物に比較して、小脳皮質では顕著な狭小化がみられ、これらは分子層と顆粒層の顕著な萎縮からなっていた(図1)。分子層ではいわゆるdendritic expansionとよばれる好銀性を示す神経突起の腫大が観察され、顆粒層では軸索の膨化を示すtorpedoがしばしば観察された。しかしながら、ブルキンエ細胞は比較的維持されており、残存していた(図2)。これら病変に一致してプリオンの蓄積は小脳皮質を中心に観察された。顆粒層が残存する領域では顆粒層を中心に蓄積がみられ、顆粒層の消失に伴い分子層でのプリオン蓄積とアストログリオシスが顕著になる傾向がみられた(図4)。抗Calbindine抗体陽性を示すブルキンエ細胞の樹状突起と軸索突起の腫大が分子層および顆粒層に観察された(図5)。抗MAP2抗体では健常モルモット小

脳では顆粒層Golgi神経細胞を含む神経細胞から分子層に至る神経突起や星状細胞が陽性を示した。BSE感染モルモットでは神経突起のスフェロイド様の腫大が頻繁に観察された(図6)。一方、顆粒層が比較的保存され、プリオンの蓄積が顆粒層に限局した部位では対照に比較して抗Synaptophysin抗体陽性を示すシナプスの顆粒層での減少が観察された。また、抗Calbindine抗体による樹状突起の腫大は観察されなかったが、抗MAP2抗体では顆粒層神経細胞の分子層での神経突起の腫大が観察された(図7)。

これら病変は初代から三代目のいずれの動物にも観察されたが、病変の程度は二代目、三代目動物に顕著であった。

### D. 考察

これまでに実施してきた他の野生型実験動物に比較してモルモット初代伝達動物では早期の発症がみられたものの、継代による早期発症モデル作出には至らなかった。

BSE伝達モルモットにおける特徴的病変は、プリオン蓄積に伴う顕著な小脳皮質の萎縮であった。BSEやScrapieなどの動物プリオン病の野外例や各種実験動物を含む動物への実験感染においてもこのような小脳病変の報告は記載がなく、動物プリオン病では新たにみだされた病態であった。このことは、モルモット固有種に限定された種特異的なものである可能性も否定できないが、新たに付け加えられるべきBSEプリオンの生物学的性状の一つと考えられた。一方、このような変化は人のsCJDの小脳病変に極めて類似する変化であるが、sCJDを含む人プリオン病を伝達した動物についてもこのような病変の記載はみられない。BSEプリオンが形成する特徴的な病変であるばかりでなく、sCJD病変の病理発生を考える上でもユニークな病態モデルであると考えられた。

小脳におけるプリオンの蓄積は顆粒層が残存する場合には顆粒層を中心にみられ分子層では蓄積がほとんどみられないか、極めて軽度であった。さらに、顆粒層の消失に伴い分子層で強くみられ、プリオンの小脳での蓄積は顆粒層から分子層へ広がる傾向がみられた。プリオンの蓄積による顆粒細胞の消失が皮質の菲薄化を生じさせていた。このような皮質の菲薄化と分子層でのプリオンの蓄積が特徴的な重度の病変部位ではブルキンエ細胞は比較的良好に保存されているが、樹状



突起や軸索の変性・腫大がみられている。一方、顆粒細胞の軸索は分子層では平行繊維として樹状突起とシナプスを形成するが、病変部位では軸索流の停滞を示唆する軸索腫大が観察されている。一方、顆粒細胞が残存し、顆粒層に局限したプリオンの蓄積がみられる軽度病変部位では分子層での平行繊維の軸索腫大がみられる。このことから、顆粒層におけるプリオンの蓄積は最終的には顆粒細胞の脱落をもたらすものの、その初期には顆粒細胞の軸索流障害を生じさせるものと推察された。また、この軽度病変部位ではプルキンエ細胞樹状突起の腫大がみられないことから、分子層へのプリオンの蓄積が樹状突起腫大に関わることが推察された。

今回シナプスについては詳細な検索を実施していないが、顆粒層へのプリオンの蓄積に伴う平行繊維の軸索障害はプルキンエ細胞樹状突起間シナプスの崩壊・消失をもたらすことが推察され、早期に機能的な障害がみられる可能性があると思われた。前述したように通常の染色ではプルキンエ細胞の脱落は顕著でなく、比較的良く保たれているように観察されたが、樹状突起や軸索では強い変性変化がみられることがこの病態では強調されるべきかもしれない。

#### E. 結論

BSE 接種モルモット小脳に顆粒細胞の脱落、プルキンエ細胞の神経突起の変性を伴う小脳皮質萎縮がみられた。このような特異的な病態が BSE プリオンの蓄積とモルモットの組合せによって生じる可能性を含め、モルモットにのみみられる理由については不明であるが、sCJD 病変の病理発生を比較検討することや BSE プリオンの性状として蓄積が神経組織に与える機序を調べるには有用なモデル系であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Song CH, Furuoka H, Kim CL, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.: Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. *J Gen Virol.* 89(Pt 6):1533-1544.(2008)

#### 2. 学会発表

- 1) 古岡秀文、堀内基広、山河芳夫、佐多徹太郎：BSE 伝達モルモット小脳の病理，第 146 回日本獣医学会(宮崎)，2008 年 9 月
- 2) Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, and Sata T: Cerebellar Pathology in Guinea Pig Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy. *NeuroPrion* 2008, October 2008, Madrid, Spain.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

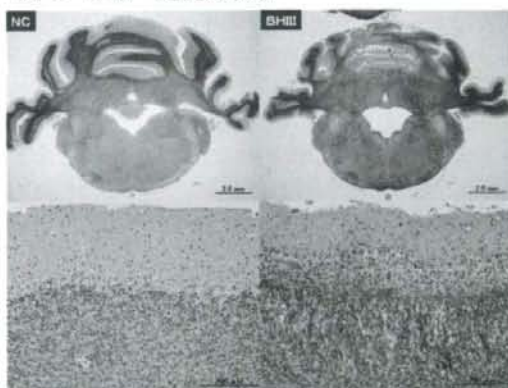
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

表1. マウス、モルモットへの BSE プリオンの伝達成績

	1st	2nd	3rd
Mice	456±26.6 (5/5)	168±7.8 (6/7)	168±6.7 (10/10)
Guinea pigs	366±30.4 (3/3)	296±29 (6/6)	310±19 (10/10)

( ) 内は発症動物数/接種動物数

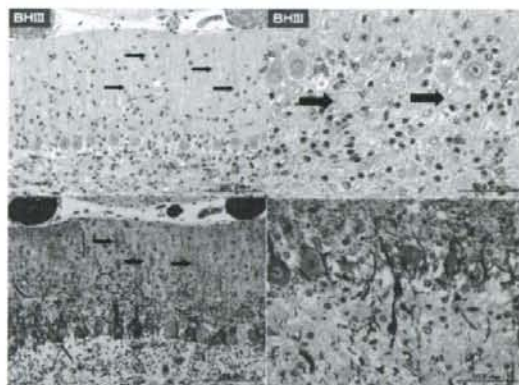
図1. 小脳・延髄冠状断



上：ルーベ拡大像(LFB-HE 染色)、下：小脳皮質部位の一部拡大像(LFB-HE 染色)、対照モルモット小脳に比較して分子層と顆粒層の菲薄化からなる小脳皮質の萎縮がみられる。

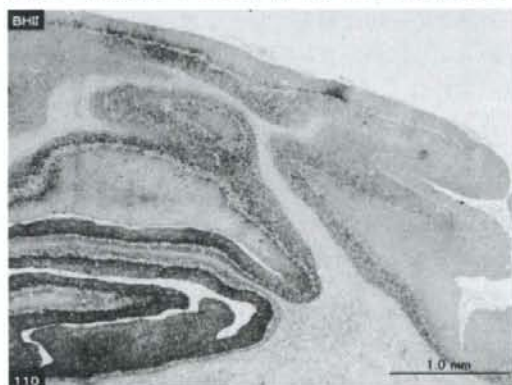
NC:対照モルモット、BHIII:BSE 接種モルモット三代目

図2. 小脳皮質強度病変部位の拡大像



左上：分子層における dendritic expansion を示す (HE 染色)、左下：同部位の Bielschowsky 染色で好銀性を示す、右上：顆粒層におけるスフェロイド (軸索腫大) を示す (HE 染色)、右下：Bielschowsky 染色による顆粒層の torpedo を示す。

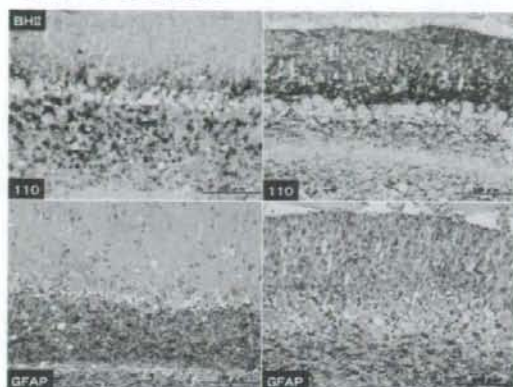
図3. 小脳抗プリオン抗体 110 による免疫染色



小脳皮質分子層から顆粒層にかけて陽性反応が観察される。

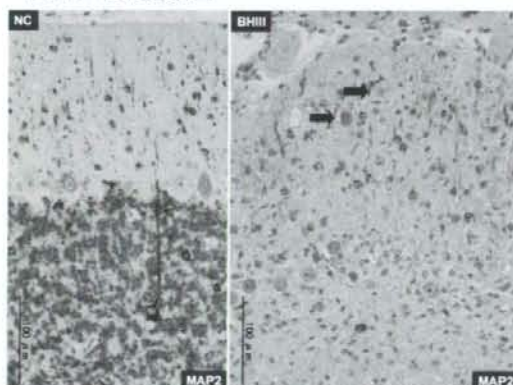
BHII:BSE 接種モルモット二代目

図 4. 小脳皮質抗プリオン抗体 110、抗 GFAP 抗体による免疫染色



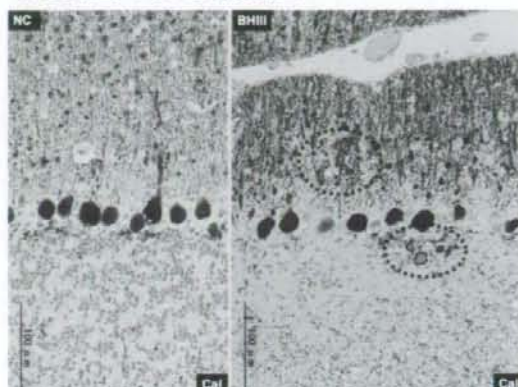
左上：抗プリオン抗体により顆粒層を中心に陽性がみられている、左下：抗 GFAP 抗体により顆粒層にアストログリオシスがみられる、右上：顆粒層の消失に一致するように分子層を中心にプリオンの蓄積がみられる、右下：顕著なグリオシスが観察され、分子層においても萎縮がみられる。

図 6. 抗 MAP2 抗体による顆粒細胞神経突起に対する免疫染色



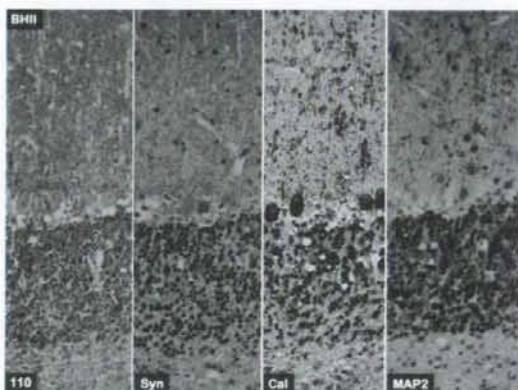
左の対照モルモットに比較して分子層に至る顆粒細胞神経突起（平行繊維）の腫大が顕著にみられる。また、矢印で示すスフェロイド様の軸索腫大も多くみられる。

図 5. 抗 Calbindine 抗体によるプルキンエ細胞神経突起に対する免疫染色



左の対照モルモットに比較して樹状突起の腫大がみられる。サークル内は限局性腫大を示す。

図 7. 軽度病変部位における各種抗体夜免疫染色



左から抗プリオン抗体 110、抗 Synaptophysin 抗体、抗 Calbindine 抗体、抗 MAP2 抗体  
顆粒層におけるプリオンの蓄積と同部位でのシナプスの減少がみられる。分子層樹状突起の腫大はみられないが、平行繊維の腫大がみられる。



### 3. 霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究

研究分担者 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 (国立感染症研究所・細胞化学部)

高橋 秀宗、飛梅 実、佐多 徹太郎 (国立感染症研究所・感染病理部)

柴田 宏昭 (医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

**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、BSE (BSE JP/8 和歌山) および非定形 BSE (BSE JP/24 佐世保) 発症ウシ脳乳剤と BSE 感染発症カニクイザルの脳乳剤と血液を接種した 16 頭の幼若カニクイザルについて定期的に血液、尿、便、脳脊髄液の採取、リンパ節および脾臓生検を実施するとともに、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継続してきた。今年度までに BSE JP/8 株を脳内接種した 3 頭のカニクイザル (#007、#010、#011) がそれぞれ接種後 2.3 年、2.3 年、3.7 年の潜伏期を経て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、起立不能となった時点で安楽死を行った。行動解析による記憶能低下、運動機能障害、誘発脳波所見における変化は WB による PrP<sup>Sc</sup> の蓄積、病変分布を反映しているものであった。発症した 3 頭中 1 頭が他に比べて 2 年遅延した潜伏期であったが、PrP<sup>Sc</sup> 蓄積および、病理所見については、ほぼ同様な組織分布を示したことから、BSE-P の脳内接種による PrP<sup>Sc</sup> の蓄積と病変形成は同一の進行過程を示すと判断できる。発症が遅延した 1 頭については病変の広がりや腰部脊髄まで広がっていたことから、緩徐な進行であるが潜伏期の延長に伴い末梢への感染拡大が示唆された。

#### A. 研究目的

ヒトの BSE 発症リスクを評価するために、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、ヒトにおける変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の病態解明および早期診断法を確立することを目的とする。併せて、BSE-P 接種後継時的に採取した血液、脳脊髄液、尿及び主要組織を研究班共通の研究資源として提供することも目的とする。

今年度までに BSE 発症ウシ脳乳剤を脳内接種した 3 頭のカニクイザルすべてが発症し、発症までに定期的に調査した臨床症状、行動機能、記憶能、脳波および安楽殺後の MRI 所見が得られたので、タンパク解析および組織病変と得られた成果を報告する。

#### B. 研究方法

##### 1) 供試動物と接種法

2~2.4 歳の育成雄カニクイザル 3 頭に、BSE JP/8

和歌山発症ウシの 10% 脳乳剤を 0.2ml 脳内投与した。感染実験は BSL3 アイソレーター飼育環境下で行い定期的に血液、尿、便、脳脊髄液の採材、リンパ節および脾臓生検を実施した。

##### 2) 視覚誘発電位測定 (Visual Evoked Potential: VEP)、聴覚脳幹部誘発電位 (Auditory Brainstem Response: ABR)

発症経過を評価する目的で、神経症状の観察とともに、経時的に視覚誘発電位 (VEP) および聴覚脳幹部誘発電位 (ABR) を測定した。測定は塩酸ケタミン-キシラジン混合麻酔下において実施した。VEP はフラッシュによる 1 Hz ランダム刺激および、4 Hz 繰り返し刺激により誘発される脳波を加算した。導出電極は左右視覚野、基準電極は導出側耳介とした。ABR はクリック音刺激を用い、90 dB、70 dB、50 dB 強度の音圧により誘発される脳波を加算した。導出電極は頭頂部、基準電極は頸部とした。