

3) 14-3-3 蛋白検出

発症した3頭の脳脊髄液を用いて14-3-3 β および γ アイソフォーム蛋白の検出を行った。脳脊髄液はSDSで加熱処理し、SDS-PAGEにて分離した後、一次抗体に(14-3-3 γ : upstate社 Anti14-3-3- γ mouse mAb (cloneCG31-2B6)及び(14-3-3 β : SantaCruz社 Anti14-3-3 β rabbit polyclonal Ab clone A6, 2次抗体にAnti mouse or rabbit Ig HRP 標識抗体(DAKO)を用いてELC発光Fuji LAS3000で検出を行った。

4) MRI 撮像

発症した3頭については安楽死後、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) ウェスタンブロッティング (WB)

細切組織をPBS中で2mm Φ のジルコニアビーズとともに攪拌(2500rpm, 5min)して5-10%乳剤を作成した。乳剤はBSE確認検査マニュアルに準じて、界面活性剤存在下にDNase, コラーゲナーゼおよびPKで消化した後、PrP^{Sc}をアルコール沈殿(2-BuOH:MeOH=5:1; 1/3 vol.)で濃縮・精製して少量のSDS-サンプルバッファーに溶解して試料とした。マニュアルに準じて電気泳動、PVDF膜への転写を行ない、一次抗体にはmAb 3F4 または 6H4 を、2次抗体には抗マウスIgG-HRP-標識抗体を用いてプリオンタンパクをECLplus 試薬で化学発光検出を行なった。プロットはLAS3000 Image Reader(Fuji Film)で記録し、陽性バンドの定量は付属のソフトウェア(Image Gauge)でおこなった。

6) 病理検索

発症し安楽死を行った3頭のうち#011を除く2頭(#007, #010)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、材料採取および脳液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/D. 研究結果および考察

1) 発症個体の臨床経過

表1にBSE発症ウシ脳朊剤を脳内接種し、vCJDを発症した3頭のカニクイザルの概要を示す。フィリピン産の2頭(#007, #010)はいずれも接種後2.3年の潜伏期間を経て発症し、半年前後の観察期間の後に安楽死させた。マレーシア産の#011は3.7年の潜伏期間を経て神経症状が認められ、その後の進行も遅く、接種後約5年目に#007, #010と同様の神経症状が発現し死亡した。潜伏期間の違いからBSE-Pに対する感受性に関わる要因として、産地に由来する遺伝的要因も考えられたが、プリオンタンパクの遺伝子型はいずれもM/M, E/E型であった。発症までの潜伏期間に顕著な差が認められたが、発症後の臨床症状には3頭ともほぼ同様な経過が観察された。すなわち、散発的な食欲不振、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)、振戦、四肢麻痺の散発、起立不能、全麻痺状態、横臥、安楽死の経過をたどった(表1)。

2) 誘発電位所見

神経生理学的検索を目的として皮質脳波とともにVEPおよびABRの測定を経時的におこなった。

VEPは#007においては神経症状末期で全身麻痺が認められた時期においても顕著な振幅の低下は認められなかった。#010では症状の進行に伴い振幅低下が認められ特に4Hz反復刺激による低下が顕著であった。#011では神経症状末期において振幅の低下が観察された。光刺激に対する振幅低下は視覚伝導路系(視神経、外側膝状体、大脳皮質視覚野)における器質的障害によるものと考えられた。また、#010に認められた低頻度反復刺激における振幅低下は刺激により誘発される電位の回復遅延が発現していると考えられた。

(図1)。

ABR は#007、#010 では末期までは明らかな潜時の遅延は認められなかったが神経症状発現末期においてV波の遅延が観察された。一方、潜伏期間の長かった#011においては発症初期よりIV波以降の潜時の遅延が認められた。ABRの振幅はいずれの動物も神経症状末期には明らかな低下が認められた。ABRの起源は蝸牛神経、橋、中脳下丘、内側膝状体、聴覚皮質と考えられ、末梢起源での潜時の遅延は軽微であるが、中脳起源と考えられるIV波以降の遅延が認められることから、中枢神経系の機能障害がより重度であると考えられた(図2)。

3) 発症に伴う14-3-3タンパク量の変化

図3にvCJD発症に伴う脳髄液中の14-3-3タンパク量の変化を示す。#007では体重減少に先立って14-3-3タンパクが検出され、症状の進行に伴って量的増加が認められた。一方、#010では症状が進行した段階で検出されている。これに対し、症状の進行が遅かった#011では長期間にわたって微量なタンパクが検出され、末期においてもその検出量は少なかった。

4) MRI所見

#007および#010において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。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。#011では解剖予定日に死亡していたことからMRI撮像は実施しなかった(図4)。

5) 神経組織におけるPrP^{Sc}の分布

図5に神経組織を用いたWBによるPrP^{Sc}組織分布を示す。また表2にWBの結果を基にして各神経組織におけるPrP^{Sc}の蓄積量を示す。BSEの脳内接種により発症した3頭ではほぼ同様なPrP^{Sc}の神経組織分布が認められることから、BSE-Pの脳内接種によるPrP^{Sc}の蓄積過程はほぼ同様な経過をたどることが推測された。潜伏期の長かった#011では脊髄においても多量のPrP^{Sc}が検出された。

6) 病理検索

BSEを脳内接種後、3年目に発症し安楽死および、5年目に死亡した3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の局在について免疫組織学的解析を行ったところ大脳皮質、海馬小脳等中枢神経系全域および脊髄に従来のBSEと同じ細顆粒状のプリオンの陽性像がみられ、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。誘発電位伝導路系にあたる、大脳皮質、内外側膝状体、上丘、下丘においても同様に病変が観察された。潜伏期が2年長かった#011における異常型プリオンの分布は他の2頭と比較して顕著な差は認められなかったが、より凝集した所見を呈していた。また、海綿状変性の程度はいずれの動物も同程度であったが、#011ではグリアの増生が顕著であった(図6, 7, 8, 9)。

E. 結論

BSEを発症したウシ脳乳剤を脳内接種し、vCJDを発症した3頭のカニクイザルで、臨床症状、神経機能、神経組織におけるPrP^{Sc}の分布及び蓄積量を調査した。その結果、発症までの潜伏期間に顕著な差が認められたが、発症後の臨床症状には3頭ともほぼ同様な経過が観察され、振戦、四肢麻痺の散発、起立不能、全麻痺状態、横臥、安楽死の経過をたどった。誘発脳波所見における変化はWBによるPrP^{Sc}の蓄積、病理所見を反映しているものであった。PrP^{Sc}蓄積がより重度な中枢神経系の変化と対応してまた神経組織におけるPrP^{Sc}の蓄積量には個体差が認められたが、3頭とも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^{Sc}の蓄積と病変形成はほぼ同様な進行過程を示すと判断できる。今回発症した3頭については、脳髄液を含め発症までの期間に定期的に採材した材料が保管されており、PrP^{Sc}の高感度検出系が開発された段階で、早期診断法の開発を目的とした検索に利用する予定である。

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
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし

表1. BSE脳内接種カニクイザルの臨床経過

| 接種日 | 2003/8/6 | 2003/9/13 | 2003/9/13 |
|-------|---|--|---|
| 接種ルート | 脳内接種 | | |
| 番号 | #007 | #010 | #011 |
| 国籍 | フィリピン | フィリピン | マレーシア |
| 遺伝子型 | M/M, E/E | M/M, E/E | M/M, E/E |
| 接種年齢 | 2.0 | 2.3 | 2.4 |
| 発症年齢 | 4.3 | 4.6 | 6.1 |
| 潜伏期間 | 2.3 | 2.3 | 3.7 |
| 発症期間 | 0.8 | 0.6 | 1.2 |
| 死亡年齢 | 5.1 | 5.2 | 7.3 |
| 臨床症状 | 散発的な食欲不摂→ 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)→ 振戦、四肢の麻痺、起立不能→ 全麻痺状態、横臥 | 突発的な振戦→ 過敏行動→ あくびの頻発、間断的な振戦→ 驚愕反応の進行→ 四肢の不全麻痺→起立困難→ 全身の持続的な振戦 | 自傷行為の多発、前屈起立姿勢→ 散発的な食欲不摂、無關心、突発的な過敏行動→ 振戦、記憶力低下→ 後肢麻痺→ 横臥 |

表2. 発症カニクイザルにおけるPrP^{sc}の分布(WB法)

| 臓器 | #7 | #10 | #11 |
|---------|-----|-----|-----|
| 脳 | +++ | +++ | +++ |
| 脊髄 | ++ | ++ | +++ |
| 視神経 | +++ | ++ | ND |
| 網膜 | +++ | +++ | ++ |
| 三叉神経 | ++ | ++ | + |
| 迷走神経 | + | - | ND |
| 正中神経 | + | ND | ND |
| 腹腔神経叢 | + | - | - |
| 坐骨神経 | + | - | + |
| 胸腺 | - | - | - |
| 脾臓 | - | - | - |
| 副腎 | - | - | - |
| 扁桃 | - | - | - |
| 深頸リンパ節 | - | - | + |
| 頸下リンパ節 | + | + | + |
| 肺門リンパ節 | - | - | - |
| 腋窩リンパ節 | - | - | - |
| 鼠径リンパ節 | - | - | - |
| 腸間膜リンパ節 | - | - | - |

ND: not done, +++: >10ug, ++ > 200ug, + 10mg

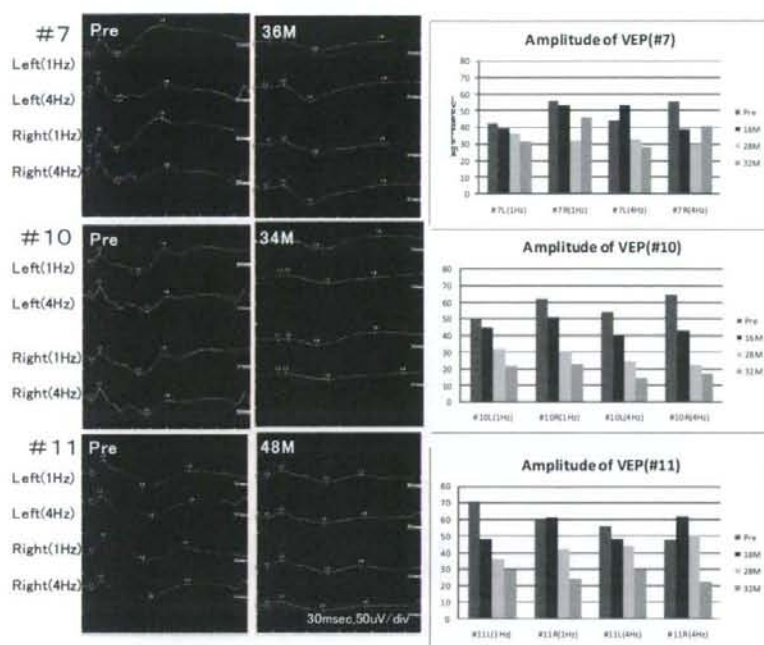


図1. 視覚誘発電位の変化

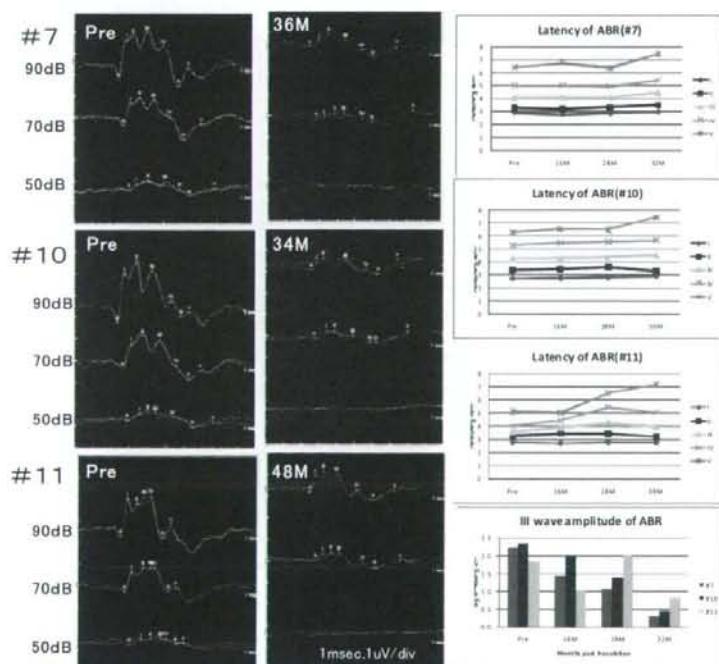


図2. 視覚誘発電位の変化

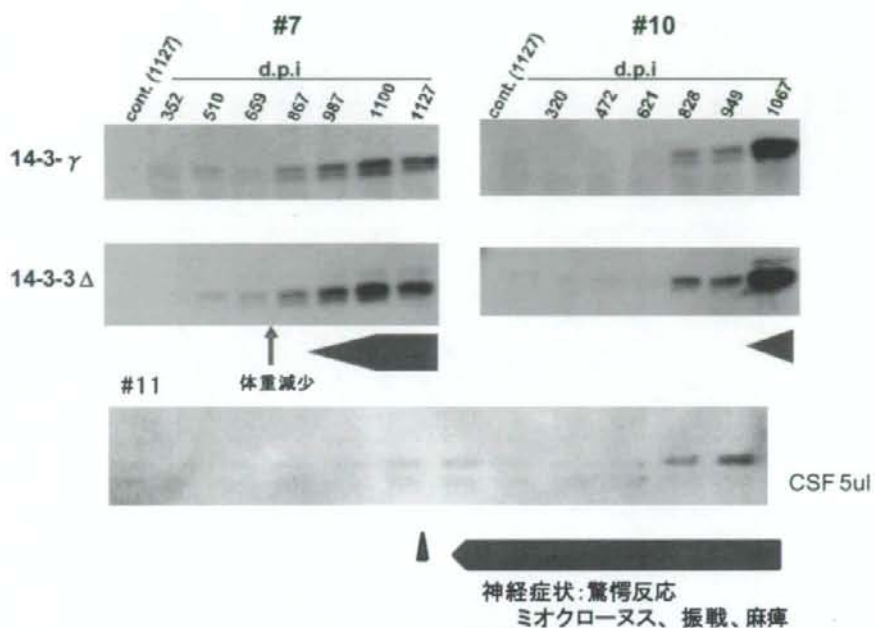
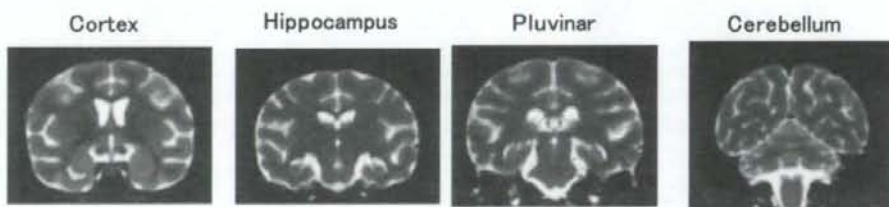


図3. 脳脊髄液中14-3-3タンパク量の変化

#007



#010

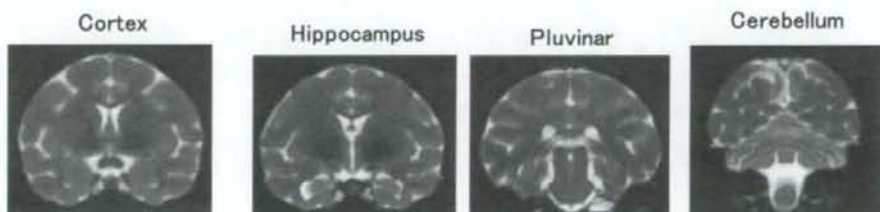


図4. 解剖時MRI T2強調画像

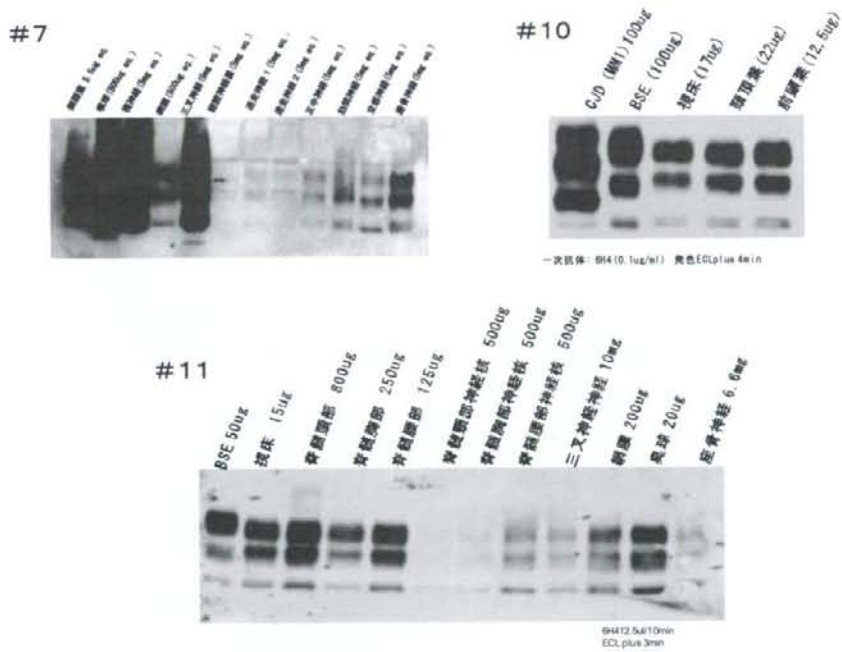


図5. 発症カニクイザル神経組織におけるPrP^{Sc}の分布(WB法)

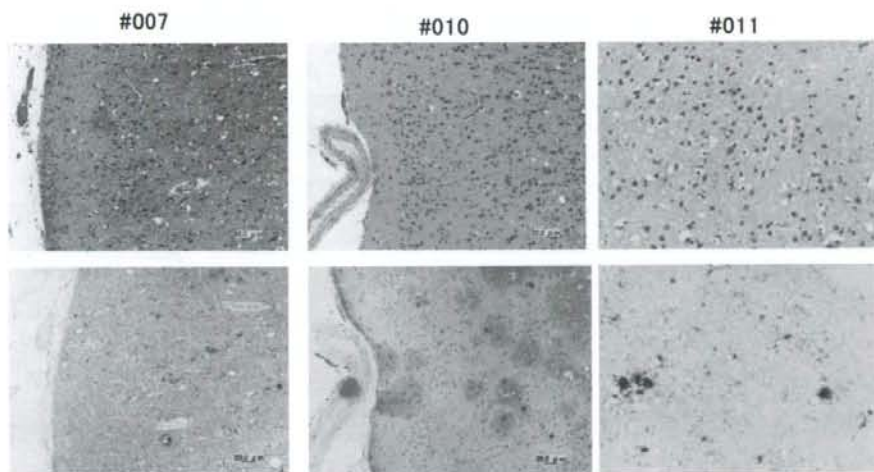


図6. 発症カニクイザル病理組織所見(大脳皮質)

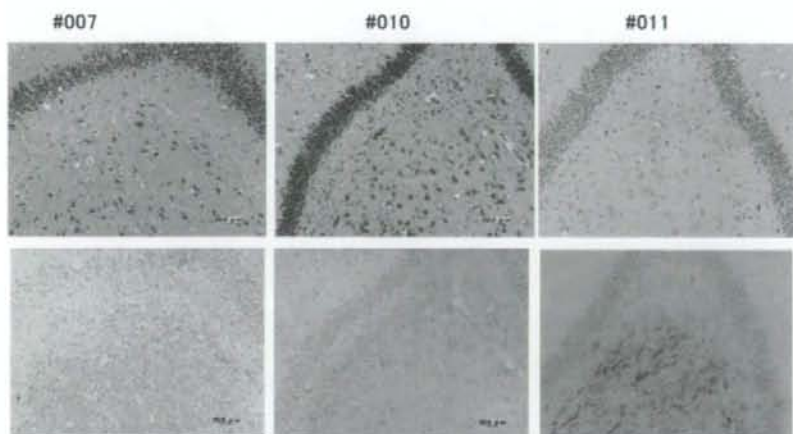


図7. 発症カニクイザル病理組織所見(海馬)

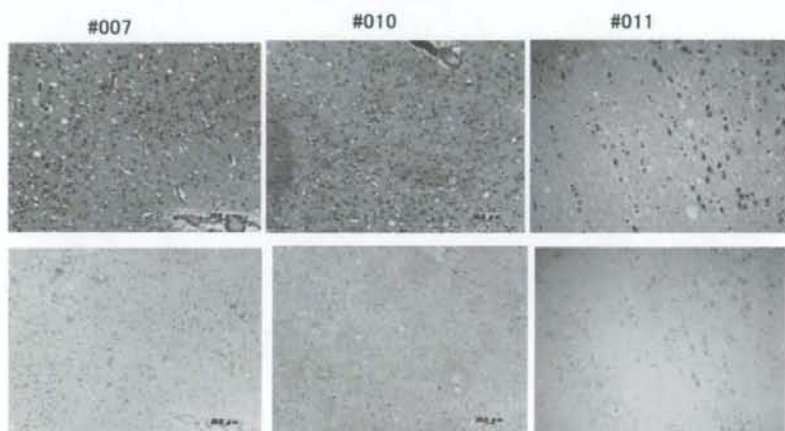


図8. 発症カニクイザル病理組織所見(視床枕)

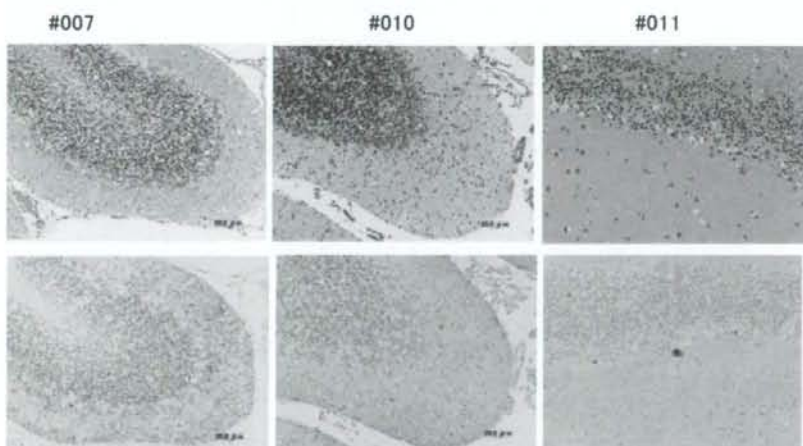


図9. 発症カニクイザル病理組織所見(小脳)

4. プリオン感染における腸管リンパ組織と免疫系細胞の役割の研究

研究分担者 石黒 直隆 岐阜大学 応用生物科学部

研究要旨 牛海綿状脳症やスクレイピーに代表される動物プリオン病は、経口的に取りこまれたプリオンが、特定危険部位とされている回腸遠位部の免疫系細胞にて増幅後、神経系に移行して発症すると考えている。しかし、免疫系からの神経系へのプリオンの伝播に関してはっきりとした証拠がなく、生体内にてトレースすることも困難である。本年度は、免疫系細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播機構を培養細胞を用いて検討した。マウスマクロファージ (M ϕ) Raw 株および J774 株にマウススクレイピー帯広株およびチャンドラー株の脳乳剤を添加したところ、プリオンの一過性の増幅が観察されたが、その後は急速に分解された。神経系細胞として妊娠胎児由来の初代神経細胞と N2a-3 細胞を用いた。初代神経細胞はプリオンの取り込みが旺盛であったが、継代培養が困難であった。そこで、Raw 株にプリオンを取り込ませた後、神経系 N2a-3 細胞と混合培養して N2a-3 へのプリオンの伝播を検討したが、伝播は確認されたものの増幅は確認できなかった。また、今年度は非定型 BSE の発症と年齢との関係を探る目的で、若齢牛と高齢牛の延髄における正常プリオン蛋白質 (PrP^C) の質と量について検討した。その結果、脳乳剤中の PrP^C 量に大きな変化は見られなかったが、プロテアソーム活性は高齢牛で極端に低かった。また、PrP^C を細胞膜蛋白質 (S2) と細胞内蛋白質 (P2) に分画して蛋白分解酵素に対する抵抗性を検討した。その結果、P2 は S2 に比べて蛋白分解酵素に抵抗性であったが、若齢牛と高齢牛で大きな差は検出されなかった。

A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) やスクレイピーは、異常プリオン蛋白質 (プリオン、PrP^{Sc}) を経口的に摂取することにより発症するとされるが、プリオンが生体内で神経系にどのように到達して発症するかは不明である。これは、プリオン病が感染後発症までに長い時間を有することと、生体内でプリオンをトレースすることが困難であることに起因する。マウスを用いたこれまでの実験で、取り込まれたプリオンは一旦濾胞樹状細胞 (FDC) にて増幅後、神経系に移行すると考えられている。こうしたマウスを用いた感染実験は、プリオン病での FDC の重要性を示唆しているが、BSE での FDC の役割については不明であり、FDC 内での BSE プリオンの蓄積も観察されていない。一方、BSE 感染牛ではプリオンを取り込んだマクロファージ (M ϕ) が散見され、マウスとは異なったプリオンの蓄積・伝播経路が考えられる。本研究では、腸管でのプリオンの取り込みに関与する M ϕ での PrP^{Sc} の動態と分解・蓄積の解析に加えて、神経系細胞への伝播機構について検討した。

今年度は、マウス M ϕ の培養細胞でのプリオンの取り込みと分解を解析し、その後神経系細胞への伝播を混合培養系を用いて解析し、免疫系から神経系へのプリオンの伝播に関して解析した。

また、今年度は、非定型 BSE の発症が高齢牛に片寄っていることに注目し、PrP^C の加齢による変化についても若齢牛と高齢牛を比較することにより脳内の PrP^C の量や性状を検討した。高齢牛のサンプルは、近年採材が困難になっており、この3年間に採取したサンプルを本研究に用いた。

B. 研究方法

1) マウス M ϕ とマウス神経系細胞の培養法

マウス培養系 M ϕ として J774 株と Raw 株を実験に用いた。また、マウスの骨髄から誘導した M ϕ も実験に用いた。両株とも 10% FCS 加 DMEM にて培養した。神経系の細胞として、妊娠マウスの脳から調整した初代神経細胞と N2a の派生株である N2a-3 (北大堀内先生より分与) を用いた。

2) 間接蛍光抗体法による細胞内への PrP^{Sc} の取

り組みの確認

マウス M ϕ Raw 株や骨髄由来 M ϕ での PrP^{Sc} の取り込みや分解を間接蛍光抗体法で経時的に解析した。両 M ϕ 培養株にマウスチャンドラー株 1% 脳乳剤を 20 μ l 添加して PrP^{Sc} を細胞に取り込ませた後、上清中のプリオンを除去した。M ϕ でのプリオンの取り込みと分解は、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間培養後にサンプルを回収して観察した。細胞内に取り込まれた PrP^{Sc} は 31C6 プリオン抗体を用いて検出し Alexa488 にて発色後、蛍光顕微鏡下にて PrP^{Sc} の局在を観察した。

3) ウェスタンブロット (WB) 解析による培養細胞での PrP^{Sc} 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、31C6 と 44B1 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。培養細胞(6cm シャーレ、1~1.5 X 10⁵) に 1%~10% マウススクレイピー帯広株あるいは 1%~10% チャンドラー感染脳乳剤を 10~100 μ l 添加培養し、経時的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^{Sc} 量を WB で解析した。

4) M ϕ と N2a-3 細胞との混合培養

マウス M ϕ 細胞が取り込んだプリオンの神経細胞への伝播を検討する目的で、チャンドラー株のマウス脳乳剤を、マウス Raw 株に添加して PrP^{Sc} を取り込ませた後、細胞を洗浄して神経細胞 N2a-3 株と混合培養した。2 日間混合培養後、ウェスタンブロットにてプリオンの伝播と増幅をチェックした。

5) 若齢牛および高齢牛の延髄からの脳乳剤の調整と定量

若齢牛(20~35 ヶ月齢 49 検体)と高齢牛(120 ヶ月以上 60 検体)の BSE 検査済みの延髄を本試験に供した。若齢牛と高齢牛の延髄門部 500mg を Yuanらの Lysis Buffer で可溶化して 10% 脳乳剤を作成した。さらに可溶化脳乳剤を 2,500rpm で 10 分遠心して上清を S1 画分として検査材料とした。S1 液内の PrP^C 量は富士レビオ FRELISA^R BSE キットを用いて ELISA 法で検出した。また、S1 液内の fibrillary acidic protein(GFAP)量は RIDSCREEN^R Risk Material 10/5 ELISA を用いて定量した。その後、S1 液は超遠心 (TLA100.3 rotor 50,000rpm) にて 1 時間遠心後、上清 (S2) と沈殿 (P2) に分

画して、PrP^C の定量や蛋白分解酵素に対する感受性試験に用いた。S2 画分は、主に細胞膜蛋白質を、P2 は主に細胞内蛋白質を多く含んでいる。

6) 延髄乳剤のプロテアソーム活性の測定

若齢牛と高齢牛の延髄由来する脳乳剤 S1 液内のプロテアソーム活性を測定する目的で、Chemicon International 社の 20S proteasome activity assay kit を用いて測定した。

8) PrP^C の PNG-F 処理と蛋白質分解酵素 (PK) に対する感受性試験

若齢牛と高齢牛由来の S2 と P2 画分を PNG-F 処理して、若齢牛と高齢牛由来の各画分での糖鎖付加部位をウェスタンブロット法で比較した。

また、若齢牛と高齢牛由来の S2 と P2 画分について蛋白分解酵素プロテナーゼ K に対する感受性を比較検討した。S2 画分および P2 画分を各濃度のプロテナーゼ K (濃度 0~5 μ g/ml) にて 37 度 30 分処理した後、ウェスタンブロットにて PrP^C を調べた。

(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た。また、プリオンを接種したマウスの飼育は P3 レベルの施設にて行った。したがって倫理上問題はない。また、若齢牛と高齢牛に由来する BSE 検査後の延髄サンプルは、岐阜県と長野県の食肉衛生検査所から分与されたものであり、各県から使用許可を得ている。

C. 研究結果

1) マウスマクロファージでのプリオンの取り込みと分解性

マウス M ϕ J774 株と Raw 株でのマウススクレイピー帯広株およびチャンドラー株の取り込みと分解性に関して検討した。J774 株および Raw 株にマウススクレイピー帯広株やチャンドラー株の 1% 脳乳剤を添加し 2 時間~4 時間接触後 PrP^{Sc} を取り込ませた。その後、脳乳剤を取り除き洗浄して M ϕ での PrP^{Sc} の増幅と分解性を検討した。M ϕ J774 株と Raw 株ともほぼ同様の結果を示した。Raw 株での PrP^{Sc} の増幅と分解の経時的な変化を図 1 に示した。洗浄後、3 時間、6 時間、12 時間と M ϕ 中の PrP^{Sc} 量は 12 時間をピークに増加したが、24 時間後には減少し始めて 48 時間後

にはウエスタンブロット解析では検出できないほど減少していた。しかし、Mφ内でのPrP^{Sc}の一過性の増加がどのような機構によるかは明らかにできなかった。

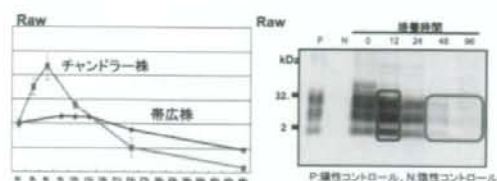


図1. マウス Mφ Raw 株での経時的な PrP^{Sc} の増幅と分解性

また、骨髄から誘導した Mφ に関しても同様にマウスクレイビー帯広株とチャンドラー株の1%脳乳剤を添加して PrP^{Sc} の増幅と分解性を検討した。骨髄由来 Mφ は PrP^{Sc} の取り込みは旺盛であると同時に分解性も旺盛であり、48 時間後では明瞭なバンドは検出できなかった。

培養系 Mφ での PrP^{Sc} の取り込みと細胞内の局在、および分解性等に関して間接蛍光抗体法で確認した。

2) 神経細胞での PrP^{Sc} の取り込みと分解性

神経細胞においても PrP^{Sc} の取り込みと蓄積および分解性に関して、妊娠マウス由来の初代神経細胞と培養系細胞である N2a-3 で検討した。N2a-3 株は、PrP^{Sc} の取り込みが旺盛で高い感染性を有していることが分かっている細胞である。初代神経細胞では、10%脳乳剤の少量でも取り込みが確認されたが、継代は困難であった。一方、N2a-3 には高濃度 (10%の脳乳剤 100 μl) の PrP^{Sc} の添加が、安定した感染細胞を得るには必要であった (図2)。

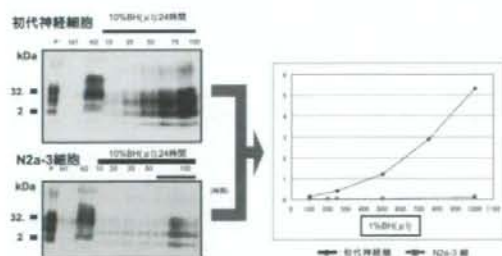


図2. 神経細胞での PrP^{Sc} の取り込みと増幅性

3) 免疫系細胞から神経細胞への PrP^{Sc} の伝播

マウス Mφ への PrP^{Sc} の取り込み実験で、PrP^{Sc} は、添加 12 時間までは細胞内での局在が顕著で

あるが、48 時間後では分解が進んでいることが明らかとなった。そこで免疫系細胞から神経系細胞への伝播実験は、Raw 株に PrP^{Sc} を 12 時間取り込ませた後に、神経細胞 N2a-3 と混合培養した。混合培養時間は 48 時間行い、ウエスタンブロット法にて PrP^{Sc} を検出した。その結果を図3に示した。

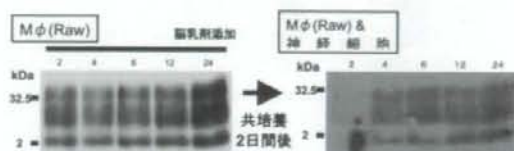


図3. Mφ から神経細胞への PrP^{Sc} の伝播

48 時間混合培養した後のウエスタンブロットの結果では、わずかに PrP^{Sc} が検出された。ただし、混合培養した N2a-3 を 2 回ほど継代したが、PrP^{Sc} の増幅は確認できなくなり、神経細胞に伝播された PrP^{Sc} が、神経細胞内で増幅されているかは確認できなかった。

4) 若齢牛と高齢牛での PrP^C の比較 (定量)

若齢牛 49 検体と高齢牛 60 検体の延髄から脳乳剤を調整し、S1 画分内の PrP^C 量を定量した。定量結果を図4に示した。

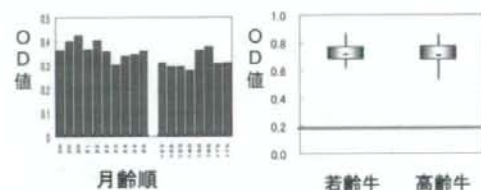


図4. 若齢牛と高齢牛の脳乳剤 (S1) 中の PrP^C の定量

若齢牛および高齢牛とも延髄由来の S1 画分液内の PrP^C 量には大きな差は見られなかった。コントロールとして用いた神経細胞に特異的な分子である GFAP 量でも若齢牛と高齢牛において大きな差はみられなかった。

5) 若齢牛と高齢牛での脳内プロテアソーム活性の比較

若齢牛と高齢牛由来の S1 画分を用いて、組織内の 20S プロテアソーム活性を比較した。若齢牛の 20S プロテアソーム活性は、高齢牛に比べて2倍以上高く、顕著に異なることが示された (図5)。蛋白分解阻害薬であるラクタシチンやロイペ

ブチンを添加した場合においても、その差は顕著であった。

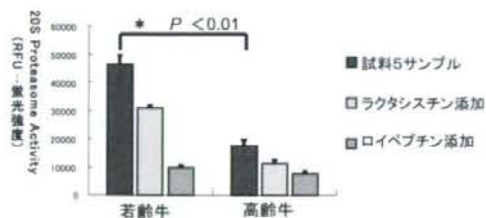


図5 若齢牛と高齢牛でのプロテアソーム活性の比較

6) 若齢牛と高齢牛における PrP^C の S2 および P2 画分の比較

若齢牛と高齢牛に由来する S1 画分をさらに超遠心を用いて分画し、膜成分の多い S2 画分と細胞内成分の多い P2 画分に分けた。各画分をウェスタンブロット解析にて分子を確認した。その結果、若齢牛および高齢牛とも S2 画分は高分子であるのに比べ、P2 画分は 25kDa 付近の分子が主であった。また、P2 画分内には、S2 画分の混入と思われる高分子と 16kDa 以下の分子も混在していた (図6)。若齢牛と高齢牛を比較した場合、S2 画分では量的な差はみられなかったが、P2 画分では若齢牛に比べて高齢牛で多く検出され、有意な差を示した。

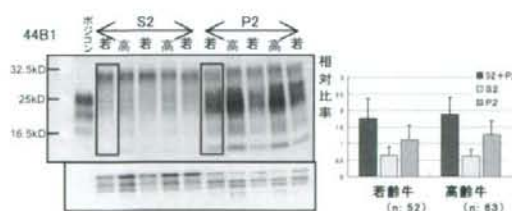


図6 脳乳剤の S2 画分と P2 画分での PrP^C の WB 像

7) 若齢牛と高齢牛での各種酵素に対する感受性

若齢牛と高齢牛由来の S2 および P2 画分に対して PNG-F 処理および PK 処理を行い、酵素に対する感受性を調べた。PNG-F 処理においては、若齢牛および高齢牛由来の S2 画分は、糖鎖が除去された分子となり、加齢による差は検出されなかった。一方 PNG-F 処理した P2 画分においては、その分子の多くが N 端を欠失した分子であったことから、糖鎖を欠失したより小さな分子として検出された。

S2 および P2 画分の PK に対する感受性を解析した (図7)。その結果、S2 分子は、若齢牛お

よび高齢牛由来とも低濃度で高い感受性を示した。一方、P2 画分は、PK に対する感受性が低く、高濃度の PK が必要であった。P2 の PK 感受性において若干高齢牛の画分の方が、若齢牛に比べて高い感受性を示した。

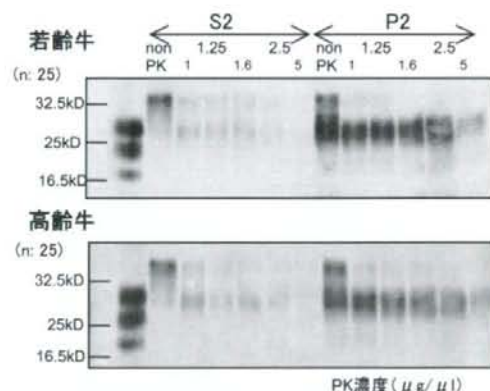


図7 若齢牛と高齢牛由来 S2 および P2 画分の PK 感受性

D. 考 察

動物プリオン病の感染において、腸管からとりこまれたプリオンは、腸管上皮のドーム領域の M 細胞やその他の上皮細胞から腸管壁内へ取り込まれるものと考えられる。腸管壁内に取り込まれたプリオンは、その後マクロファージや樹状細胞に捕捉され粘膜下組織、濾胞間、あるいは濾胞内へと移動する。プリオン病の発症の誘発は、神経系細胞への侵入にあるが、どの部位で、どの細胞が神経細胞へプリオンを伝播するかが不明である。本研究は免疫系細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播にどのような細胞がどのように関与しているかを解明することを目的としている。本年度は、マウス Mφ での取り込み、分解、増幅を検索し、神経系細胞への伝播を解析した。マウス Mφ にプリオンを取り込ませた後、神経細胞と混合培養を行い、神経細胞へのプリオンの伝播を解析した。結果的には神経細胞はプリオンを受け取っているようであるが、増幅までには至っていない。今後は、神経系細胞でのプリオンの検出系の高度化が必要である。

また、本年度は非定型 BSE の特徴である加齢に注目して、若齢牛と高齢牛での PrP^C の性状に関して比較検討した。若齢牛と高齢牛で大きく異なっていたのは、20S プロテアソーム活性で、加齢に伴い極端に低い値であることが確認された。PrP^C の全体量は、若齢牛と高齢牛で大きな差は検出されなかったが、その後、超遠心で PrP^C を分画すると、

P2 量が高齢牛で幾分多いことが示された。蛋白分解酵素 PK に対する感受性についても若齢牛と高齢牛で大きな差は見られなかった。本研究は、加齢に伴う延髄内の PrP^C の性状に関して検討したが、高齢牛に非定型 BSE の発生が効率である原因を PrP^C の性状解析からさぐることは難しかった。

E. 結 論

免疫系から神経系へのプリオンの伝播を培養細胞系にて検証することを目的に実験を行ってきた。マウス Mφ 株での PrP^{Sc} の取り込みは旺盛であったが、分解も早く 48 時間後には消失していた。マウス Mφ 株に PrP^{Sc} を取り込ませた後、神経系細胞との混合培養により神経細胞への PrP^{Sc} の伝播を検討したが、神経細胞での増幅は確認できなかった。

また、非定型 BSE の発症に関与すると思われる加齢に伴う PrP^C の変化に関して、若齢牛と高齢牛での PrP^C の性状を解析した。プロテアソーム活性を除いて、PrP^C の性状に顕著な差は見られなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishiguro N, Inosima Y, Sassa Y and Takahashi T: Molecular characterization of chicken prion proteins by C-terminal-specific monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* In press 2008.

2. 学会発表

- 1) 佐々悠木子、猪島康雄、石黒直隆：マウス感染マウスおよび rMPrP 免疫マウスにおける免疫応答と PrP^{Sc} 複製阻害効果 2008 年プリオン研究会 (北海道) 2008 年 8 月
- 2) 石黒直隆：ウシ回腸での物質の取り込み機構。第 145 回日本獣医学会学術集会 (東京) 2008 年 4 月
- 3) 吉岡祐美、猪島康雄、石黒直隆：若齢牛と高齢牛における牛正常型プリオン蛋白質の比較。第 146 回日本獣医学会学術集会 (宮崎) 2008 年 9 月
- 4) 佐々悠木子、山本実穂、猪島康雄、石黒直隆：プリオン感染マウスおよび rMPrP 免疫

マウスが保有する抗 PrP 抗体の PrP^{Sc} 複製阻害効果。第 146 回日本獣医学会学術集会 (宮崎) 2008 年 9 月

- 5) セイン・ルイン、猪島康雄、石黒直隆、上野博史：牛回腸での物質の取り込みに関与する免疫系細胞の役割。第 146 回日本獣医学会学術集会 (宮崎) 2008 年 9 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

5. BSE/JP24 (Sasebo) 病原体の近交系マウスへの伝播、 ならびに生化学・病理学的解析と株化

研究分担者 萩原 健一 国立感染症研究所 細胞化学部

研究協力者 山河芳夫、原 英之、大内史子 (国立感染症研究所・細胞化学部)
佐藤由子 (国立感染症研究所・感染病理部)

研究要旨 BSE/JP24 (Sasebo) 例は、ウシ脳に蓄積した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が1糖鎖型に富み (生化学的特徴)、また、脳組織に PrP^{Sc} のアミロイドプラークが認められる (病理組織学的・免疫組織化学的特徴) という点で、従来の定型 BSE 罹患ウシとは異なる。本研究では、BSE/JP24 と定型 BSE の病原体の感染性を比較することを目的として、近交系マウスへの伝播実験を行った。その結果、国内で摘発された定型 BSE 罹患ウシ2例の脳ホモジネートを接種した 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、採材した脳、脾臓、回腸遠位部のウエスタンブロット分析および免疫組織化学分析では PrP^{Sc} の蓄積が検出され、病理組織観察では脳の空胞変性を認めた。一方、非定型 BSE プリオンを接種したマウスは、非接種マウスの寿命に相当する長期間の経過観察を行ったが PrP^{Sc} 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。(なお、本研究の相補実験として、本研究班の横山隆博士らは BSE/JP24 の病原体がウシ型マウスへは伝播可能であることを示した。) 以上より、BSE/JP24 の病原体は、罹患ウシにおいて認められた PrP^{Sc} の生化学的・病理組織学的・免疫組織化学的特徴のみならず、その感染性についても定型 BSE と明らかな差異があることがわかった。

A. 研究目的・背景

BSE/JP24 (Sasebo) 例は、蓄積した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の糖鎖型がウエスタンブロット分析においてヒト・孤発性 CJD type 2 の PrP^{Sc} に類似し、また、脳組織の一部に PrP^{Sc} のアミロイドプラークを形成するという、従来の定型 BSE 罹患ウシとは異なった特徴をもつ (Hagiwara K, *et al*, *Jpn J Inf Dis* 60: 305, 2007)。同様の糖鎖型は欧州で見いだされた BASE 病原体 (Casalone C, *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3065, 2004) にも認められているが、罹患ウシの病理組織所見は両者において必ずしも合致しない。

そこで本研究では、1) 非定型 BSE は、果たして近交系マウスへ伝播可能であろうかという点、および 2) 非定型 BSE が近交系マウスへ伝播可能である場合、伝播後にマウスの病変組織に蓄積する異常型プリオン蛋白質は、「非定型」に特有の糖鎖型を維持するのか、それとも従来の「定型 (典型)」BSE の糖鎖型へ収束するのであるか、という2点について検証を行ない、我が国の非定型 BSE プリオン病原体についての知見を深めることを目的とした。もし近交系マウスに対して伝播

し得る場合には、継代伝播を行ないプリオン病原体の株化を進める。

B. 研究方法

BSE/JP24 (Sasebo) の対照検体として、国内の BSE 全頭検査で摘発された BSE 罹患ウシのうち国立感染症研究所で確定検査を行った BSE/JP6 (Wakayama) (1996年2月生まれ) の定型例; 屠畜時 83ケ月例) および BSE/JP12 (Kumamoto) (1999年7月生まれ) の定型例; 屠畜時 62ケ月例) の2種を用いた。上記の BSE 罹患ウシ3例 (BSE/JP24、BSE/JP6、BSE/JP12) の 20% 脳乳剤をリン酸緩衝液を用いて調製し、常法によるプロテイナーゼ K (PK) 消化後、ウエスタンブロット法ならびに Plateria ELISA キット (BioRad) により試料中の PrP^{Sc} 量を定量した。これらの定量値をもとに、各脳乳剤が同等の PrP^{Sc} 量 (Plateria ELISA での同等のシグナル強度) を与えるように生理食塩水により希釈して、接種材料を調製した。脳内接種時のマウスへの負担を避けるため、乳剤の組織湿重量が 2% (wt/v) 以下となるようにしたため、具体的な接種材料は以下のような濃度となった:

BSE/JP6=0.2% (wt/v)、BSE/JP12=2% (wt/v)、BSE/JP24=1% (wt/v)。この接種材料 25 μ L を下記の近交系マウス 3 系統に対し、2 段針 (星盛堂医療器工業) を用いて頭蓋矢状縫合およびその近傍より脳内に接種した: C57BL/6J (6 週齢♀; BSE/JP6=11 匹、BSE/JP12=11 匹、BSE/JP24=11 匹、以上 2006 年 9 月接種、無接種=7 匹)、SJL (6 週齢♀; BSE/JP6=12 匹、BSE/JP12=12 匹、BSE/JP24=12 匹、以上 2006 年 9 月接種、無接種=6 匹、2006 年 9 月接種) および RIII マウス (4~8 週齢♀/♂; BSE/JP6=6 匹、BSE/JP12=6 匹、BSE/JP24=9 匹、以上 2006 年 10 月接種、無接種=2 匹)。

プリオン病症状を呈したマウスは人道的エンドポイントを踏まえて安楽殺に処し、脳・脾臓・回腸遠位部を採材した。また、プリオン病様の症状とは断定できないが長期飼育期間中 (SJL マウス; 最大およそ 520 日、C57BL/6J および RIII マウス; 最大およそ 840 日) に何らかの病的症状を呈したマウスは安楽殺に処し、同様に採材した。採材部位は -80°C にて保管あるいはホルマリン固定を施し、常法によりウエスタンブロット分析 (44B1 抗体を主として使用) および病理・免疫組織化学分析 (T2 抗体を主として使用) を行った。ウエスタンブロット分析は、BSE 罹患ウシの脳組織および Obihiro 1 株の接種により発症したマウスの脳組織のホモジネートを PK 消化したものの規定量を陽性コントロールとして用い、コントロールのシグナル強度で標準化することにより各採材試料中に検出された PrP^{Sc} 量を定量的に比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得て実施した。また、感染材料の取り扱いには国立感染症研究所のバイオセーフティ規約を遵守した。

C. 研究結果

BSE/JP6 および BSE/JP12 の脳ホモジネートを接種した 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。採材した脳、脾臓、回腸遠位部についてウエスタンブロット法ならびに免疫組織化学染色法により PrP^{Sc} を検索したところ、PrP^{Sc} の蓄積が検出され (表 1)、病理組織観察では脳の空胞変性を認めた。一方、非定型 BSE

プリオンを接種したマウスは、非接種の健常マウスの寿命に相当する長期間の経過観察を行った (SJL; 408 日、C57BL/6J; 813 日、RIII; 688 日 (2009 年 2 月 1 日現在 832 日目で観察継続中)) が PrP^{Sc} 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 (表 1)。唯一の例外として、BSE/JP24 を接種した SJL マウスの 1 匹の脳のウエスタンブロット分析において、抗 PrP 抗体により検出される弱いシグナルが検出された。また、興味深いことに、BSE/JP12 を接種した SJL マウス 1 匹の脾臓のウエスタンブロット分析において非定型 BSE に似た糖鎖型シグナルを示す PrP^{Sc} が認められた。初代伝播実験で得たこれらの試料を 2008 年 7 月に同系統マウスを用いた 2 次伝播実験へ供し、現在、経過を観察中である。

D. 結論

本研究で用いた近交系マウスの初代伝播において、BSE/JP24 病原体は被接種マウスに PrP^{Sc} の蓄積や神経組織の変性を起こさなかった。本研究と並行して本研究班の横山隆博士らが進めたウシ型プリオン蛋白質を発現するマウスを用いた伝播実験においては、不思議なことに BSE/JP24 病原体は定型 BSE プリオンよりも短い潜伏期を経てウシ型マウスを発症せしめ、かつ、病変組織に蓄積した PrP^{Sc} のウエスタンブロット像は非定型 BSE-L 型を示すという結果を得た (発表論文リストの 2))。以上のように、BSE/JP24 の病原体は、罹患ウシにおいて認められた病理組織学的・免疫組織化学的特徴や PrP^{Sc} の生化学的特徴のみならず、その感染性においても定型 BSE と明らかな差異を示すことがわかった。

E. 考察

S.E. Lloyd らは、或る 1 頭の BSE 罹患ウシの脳ホモジネート (このホモジネートのウエスタンブロット像は、定型 BSE の糖鎖型を示す) を C57BL/6 マウスに接種すると定型 BSE の糖鎖型・病理学的性状を呈するが、SJL マウスに接種したところ、予想に反してヒト孤発性 CJD に類似した糖鎖型・病理学的特徴を呈したという (*J.Gen.Virol.* (2004), **85**, 2471)。この現象が、脳ホモジネート中に異なる BSE 株が混在していたためなのか、または SJL マウスへの接種によって異なる BSE 株が *de novo* に産生されたためなのか不明であるが、前者の仮定に立つと、C57BL/6 マウスを伝播宿主に用いると定型 BSE の糖鎖型・病理

表1 初代伝播実験のまとめ

| inoculum (ウシ脳ホモジネート) | 接種 マウス系統 | 接種 個体数 | PrP ^{Sc} 陽性数 / WB分析に かけた匹数 ¹⁾ | PrP ^{Sc} 陽性個体の生存日数 最短日数-最長日数 (平均日数) |
|-------------------------|-------------|-----------|---|---|
| BSE/JP6 | C57BL/6J | 11 | 7 ²⁾ /11 | 511-729 (645.9) |
| | SJL | 12 | 8/9 | 262-408 (338.5) |
| | RIII | 6 | 5/5 | 430-669 (572.6) |
| BSE/JP12 | C57BL/6J | 11 | 9/10 | 415-729 (613.8) |
| | SJL | 12 | 9 ³⁾ /9 | 262-588 (421.9) |
| | RIII | 6 | 4/5 | 407-560 (499.0) |
| BSE/JP24 | C57BL/6J | 11 | 0/10 | 813でもPrP ^{Sc} は検出されず |
| | SJL | 12 | 0 ⁴⁾ /10 | 408でもPrP ^{Sc} は検出されず ⁴⁾ |
| | RIII | 9 | 0/6 | 731でもPrP ^{Sc} は検出されず |

1) 接種後250日目以降にウエスタンブロット(WB)分析にかけた個体数。

2) WB分析で、脳、脾、回腸遠位部のいずれかにPrP^{Sc}が有意(-, +, ++, +++の3段階評価の+以上)に検出された個体数。

3) ヒトCJD2型の糖鎖型に類似するバンドを1匹(脾)に認めた。

4) 定型BSEの糖鎖型に類似する弱いバンド(強度は±)を1匹(脳)に認めた。

組織型が優位に現れるが、SJL マウスを宿主に用いると混在する非定型株が優位に現れる、と推察される。Lloyd らの報告を鑑み、本研究ではC57BL/6、SJL、RIII の3系統のマウスへBSE/JP24の脳ホモジネートを接種した。すなわち、BSE/JP24の脳ホモジネートをSJL マウスへ接種すると、ウシ(BSE/JP24)の脳組織で認められた糖鎖型や病理学的特徴が維持されたままSJL マウスへ伝播するのではないかと期待した。しかし結果は、SJL マウスの生存期間中には脳、脾、回腸遠位部におけるPrP^{Sc}の明らかな蓄積は検出できなかった。一方、ウエスタンブロット分析で非定型BSEに似た糖鎖型を示すPrP^{Sc}がBSE/JP12を接種したSJL マウス1匹の脾臓において認められた。これについては、BSE/JP12脳ホモジネート中にもともと微量の非定型BSE株が混在していたためなのか、SJL マウスが*de novo*に非定型BSEを産生したためなのか、結果の解釈は上述のLloydらの報告と同じく難しい。

本研究の途上で、先にイタリアで摘発されたBASEの病原体は、C57BL/6およびSJL マウスへの初代伝播ではPrP^{Sc}蓄積が検出されないが、これらのマウスに対して2代目の継代を行うと定型BSEと区別不能な糖鎖型および病理学的特徴を生じたという実験結果が報告された(Capobianco R, *et al*, *PLoS Pathog* 3: e31, 2007)。本

研究の初代伝播実験で得た脳、脾臓ホモジネートは同系マウスへの2代目接種を既に済ませており(2008年7月~)、これらのマウスの経過観察によりBASEとの相違点がより詳細に議論できるようになるであろう。また、近交系マウスよりもウシ型マウスがBSE/24JP病原体に対してなぜ高い感受性を示すのか、興味深い今後の課題と考える。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) O.-Nakamura Y, Yamakawa Y, Hanada K, Tanaka K, Miura M, Tanida I, Nishijima M, Hagiwara K: Synthetic fibril peptide promotes clearance of scrapie prion protein by lysosomal degradation. *Microbiol Immunol* 52: 355-363, 2008.
- 2) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T: Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2:

123-128, 2008.

2. 学会発表

- 1) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Kurachi M, Shimizu Y, Kasai K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T: Biological and biochemical characterization of L-type BSE prion detected in Japanese beef cattle. "Prion 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

6. ヒト型プリオン蛋白ノックインマウスを用いた vCJD プリオンの感染実験

研究分担者 北本 哲之 東北大学大学院 医学系研究科

研究要旨 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。興味あることに、ヘテロツアイガスの Hu129M/V マウスは、ヘミツアイガスの Hu129M/0 と比べて、そして Hu219E/K マウスはホモツアイガスの 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。今回の報告書では、この Heterozygous inhibition の結果を報告するとともにその機構を説明するためのモデルとして stone fence model (石垣モデル) を記載した。

A. 研究目的

我が国のヒトのプリオン蛋白多型性には、以下のような遺伝子型が存在する。コドン 129 に関しては、129M/M, 129M/V, 129V/V という遺伝子型があり、コドン 219 に関しては、219E/E, 219E/K, 219K/K がある。現時点までの遺伝子解析の結果、コドン 129 とコドン 219 の関係に関しては、コドン 129M のプリオン蛋白の中にコドン 219E と 219K が存在し、コドン 129V のプリオン蛋白は全てコドン 219 に関しては 219E である。この遺伝子型のプリオン蛋白が vCJD プリオン感染に対して感受性をもつのかは、vCJD プリオンの輸血などの 2 次感染を考える上で必要な情報である。この感受性検討に関して、直接ヒト型のプリオン蛋白遺伝子の多型性を導入したノックインマウスを作製して、vCJD プリオンに対する感受性を検討するのが本研究の主な目的である。

B. 研究方法

【材料】 感染因子として、2 例の vCJD 剖検脳乳剤 (10%) を用意した。実験動物として以下の遺伝子型のマウスを用意した。遺伝子型は、HuPrP129M/M, 129M/V, 129M/0 (KO マウスと交配したヘミ型マウス), 129V/V, 219K/K, 219K/0, 219E/E (129M/M と同じ), 219E/0 (129M/0 と同じ), 219E/K というマウスである。

【方法】 感染は腹腔内に 10% 脳乳剤を 50 μ l 投与後 75 日後、脾臓を用いて感染の有無を検討した。マウスの脾臓の半分を免疫染色検査 (Kitamoto et al, 1991) に、残りの半分を Western blot 検査 (Asano et al, 2006) に利用した。

C. 研究結果

1) 219 シリーズでは、全てのマウスで異常プリオン蛋白が検出でき、以下の順に多くなる PrP^{Sc} が検出された。219E/K < 219E/0 < 219E/E < 219K/0 < 219K/K の順である。まず、特筆すべきは 219K の異常化が 219E の異常化より効率よく起こることが明らかになった。219E/E よりもその半分の発現量しかない 219K/0 の PrP^{Sc} の方が多いのである。219E は、PrP129M と同じ分子のことであるから、英国の vCJD が 129M/M のみであることから、日本人のなかにごく少数存在する 219K/K のヒトは vCJD に感染しやすいことになる。もう一つの大きな結果は、219E/K というヘテロの遺伝子型のモデルが最も少ない PrP^{Sc} 量を示したことである。

2) 129 シリーズでは、V/V マウスで異常プリオン蛋白は検出できず (Asano et al, 2006)、残りのマウスからは以下の順で多くなる PrP^{Sc} が検出された。M/V < M/0 < M/M という順である。組織学的検索でもこの順番に PrP^{Sc} が多くなった。Asano らの報告で、Hu129M/V が異常化するのとは解っていたが、129V/V が異常化しないため、heterozygous inhibition という現象が存在するのかどうかは、Hu129M/0 という hemizygous model と比較する必要があった。これらの動物モデルの感染実験の結果、明らかに Hu129M/V の方が異常型プリオン蛋白の量が少なかった。

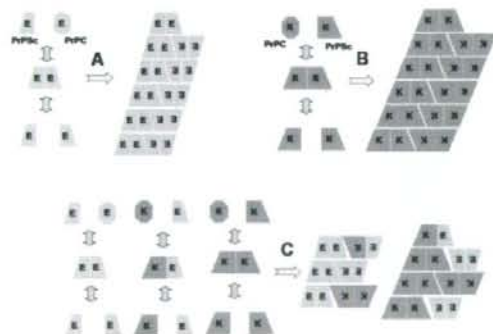
D. 考察

従来から heterozygous inhibition の存在は、129M/V のヒトが sCJD の頻度として少ないということから想定されていた。しかし、実験的に PrP^{Sc} となりうる conversion-competent PrP 分

子を用いて heterozygous inhibition を示したのははじめてである。従来は、発現量がまちまちの conversion-incompetent PrP 分子のトランスジェニックマウスを用いて野生型マウスプリオン蛋白分子の異常化を阻害することから、dominant negative inhibition を提示する研究が主であり、そのメカニズムとして Protein X などを想定していた。しかしながら、異常化する2つの分子 219E と 219K を用いても、一方が異常化しない2つの分子 129M と 129V を用いても heterozygous inhibition を示すことが明らかとなり、新しい分子メカニズムを提唱すべきと考えた。ここで、図のようにホモやヘミの場合は同じ形のブロックが積み上がるので PrP^{Sc} という石垣 (アミロイド) を積み上げるのは簡単であるが、2種類の形の異なったブロックを用いて石垣を積み上げるのは効率が良くないのではないかという石垣モデル (stone fence model) を提唱した。

E. 結論

PrP^{Sc} の量が E/K 動物で、E/O や K/O マウスの和にならずにそれ単独よりも少なくなったという事実から、プリオン病の新しい沈着モデルとして蛋白構造の異なる石垣モデルを提唱した。



F. 健康危機情報

日本人の12%に見られる遺伝子多型で、従来 sCJD でほとんど観察されない多型であることから、プリオン感染に抵抗性と考えられていたコドン 219E/K の遺伝子型であるが、今回 vCJD プリオン感染には感受性を持つことが明らかとなった。特に、コドン 219K/K というホモ型の遺伝子型のヒトは、vCJD 感染に対してコドン 129M/M(219E/E)の遺伝子型のヒトよりも高い感受性を持つ可能性がヒト型プリオン蛋白遺伝子導入した動物実験から示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Sobue G: Clinicopathologic characteristics of five autopsied cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 2008,28:51-61.
- 2) Hoshino A, Iwasaki Y, Izumi M, Kimura S, Ibi T, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y, Sahashi K: MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with unusually prolonged disease duration presenting with panencephalopathy-type pathology. *Neuropathology*. 2008 (in press)
- 3) Ikeda S, Kobayashi A, Kitamoto T: Thr but Asn of the N-glycosylation sites of PrP is indispensable for its misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008,369:1195-1198.
- 4) Niimi Y, Iwasaki Y, Umemura T, Tanaka F, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Hirayama M, Sobue G: MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with early stage cerebral cortical pathology presenting with a rapidly progressive clinical course. *Neuropathology*. 2008,28:645-651.
- 5) Haraguchi T, Terada S, Ishizu H, Sakai K, Tanabe Y, Nagai T, Takata H, Nobukuni K, Ihara Y, Kitamoto T, Kuroda S: Coexistence of Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease pathology: An autopsy case showing typical clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 2008 (in press)
- 6) Kobayashi A, Arima K, Ogawa M, Murata M, Fukuda T, Kitamoto T: Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta Neuropathol*. 2008,116:561-566.
- 7) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T: Human PrP 219K is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in vCJD infection. *J Biol Chem*. 2009 (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録
なし