

200939026A

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21年度 総括・分担研究報告書

平成22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21年度 総括・分担研究報告書

平成22年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成21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
班員名簿

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・基礎獣医学研究部門・病態予防学分野・病態病理学研究室	教授
柴田 宏昭	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	プロジェクト研究員
萩原 健一	国立感染症研究所・細胞化学部	室長
石黒 直隆	岐阜大学応用生物科学部・獣医学課程	教授
北本 哲之	東北大学大学院医学系研究科・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・動物衛生研究所プリオン病研究センター・プリオン病研究チーム	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・動物衛生研究所プリオン病研究センター・プリオン病研究チーム	チーム長
新 竜一郎	長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科	助教
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	東北大学大学院医学系研究科・創生応用医学センター	教授

目 次

I. 食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

総括研究報告書（平成 21 年度）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

研究代表者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

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・・・・・・・・・・ 7

研究分担者：福田 茂夫（北海道立畜産試験場・基盤研究部）

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・・・・・・・・ 11

研究分担者：古岡 秀文（帯広畜産大学・基礎獣医学部門）

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・・・・・・・・・・ 17

研究分担者：柴田 宏昭（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

4. 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・・・・ 27

研究分担者：萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）

5. 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・・・・・・・・ 31

研究分担者：石黒 直隆（岐阜大学・応用生物科学部）

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・・・・ 37

研究分担者：北本 哲之（東北大学大学院・医学系研究科）

7. 非定型 BSE プリオンの「種の壁」の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

研究分担者：横山 隆（動物衛生研究所・プリオン病研究センター）

8. 非定型 BSE の高感度検出法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

研究分担者：村山 裕一（動物衛生研究所・プリオン病研究チーム）

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	49
研究分担者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
11. トランスクリプトームによるプリオン病の病態解析	55
研究分担者：堀内 基広（北海道大学大学院・獣医学研究科）	
12. 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

平成 21 年度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（H20-食品-一般-008）

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っている。非定型 BSE は定型 BSE に比べて病原性が高いことが明かとなった。非定型 BSE は近交系マウスには伝達しなかったが、サルは定型 BSE 例と比べて半分の潜伏期間で発症し、定型 BSE を接種したサルとは異なる病理所見を示した。非定型 BSE はキメラマウスの実験でも定型 BSE と異なる宿主感受性を示した。脳内発現サイトカインの役割はプリオン病の病態においてきわめて限定的であった。牛回腸ループに投与した組換えマウスプリオンタンパク質は M 細胞のドームや粘膜下組織で樹状細胞やマクロファージに取り込まれた。プリオンの取り込みに関与する宿主因子 Peripherin を同定し、プリオン病の進行と病態に影響する可能性を見いだした。またプリオン産生に影響する宿主因子として LRP1 を同定した。vCJD プリオンをヒト型 129V/V ノックインマウスに腹腔内投与しても脾臓に沈着はみられなかったが、脳内投与では高率に感染しプリオン沈着がみられた。PMCA 法で非定型 BSE プリオンはある程度増幅でき、また定型 BSE プリオン接種サル由来のプリオンも十分増殖できるようになった。Realtime QUIC 法を開発し定型 BSE プリオン増殖が可能となった。以上のことから、次年度にはこれまでの研究の集大成となる結果が期待できる。

研究分担者：

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）

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てきた。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図り、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投与による伝達試験を実施し、BSEプリオンの性状や動物における体内分布を明らかにするとともに、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感染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の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等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、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ので、ウシやヒツジの小腸ループ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て同定できたので、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)。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宿主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。非定型 BSE の脳内接種、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(柴田、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。非定型 BSE を脳内接種した 5 頭について、2 頭を 9 ヶ月後、3 頭を 16 ヶ月後に剖検した。接種後 11 ヶ

月で臨床上的変化が認められ、剖検直前には四肢の震えや起立困難等も観察できた。WB法の検討結果では、9ヶ月後でも脳幹を中心に小脳、視床、海馬および線状体にプリオンが沈着し、16ヶ月では全脳域に広がっていた。WBのパターンは接種プリオンと同様で、黒毛和種とホルスタイン種による差異はなかった(福田)。帯広株を接種したサイトカイン欠損マウスはいずれも発症した。IL-12a と b および IL12rb2 欠損マウスでは潜伏期の短縮が、CCL2 欠損マウスでは延長がみられた。アストロサイトやミクログリアの集積と突起の伸展について差異がみられた。非定型 BSE はマウス、ハタネズミ、モルモットには伝達できなかった(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 マウスでは組織に PrP^{Sc} の蓄積がみられたが、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 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(萩原)。回腸ループに投与した組換えマウスプリオンタンパク質は M 細胞のドームや粘膜下組織で樹状細胞やマクロファージに取り込まれた。マクロファージ内でのプリオンの分解はプロテアソーム系とリソソーム系の両者で行われていることがわかった(石黒)。PrP^{Sc} 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、PrP^{Sc} の取り込み及び感染成立に関与する生体側因子として peripherin を同定した。プリオンの存在によってこの分子の細胞内局在が変化した。この分子のトランスジェニックマウスを作製しプリオンを接種したところ生存が長い傾向がみられた(佐多)。Cd14 分子は病気の進行に関与する可能性が考えられ

たのでノックアウトマウスを用いてさらに実験を行ったところ、一部のミクログリアの活性化状態が対照マウスと異なり、さらに炎症性サイトカイン発現の違いによる病態への関与が考えられた(堀内)。プリオンの産生に影響する宿主因子として、低密度リポタンパク質受容体関連蛋白質 1 (LRP1) を発見した(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)を各種のトランスジェニックマウスに接種した。ハムスター型のプリオン遺伝子をもつマウスに感染したがマウス型の遺伝子をもつマウスには感染しなかった。これは定型 BSE とまったく異なる結果となった。また非定型 BSE プリオンをシリアンハムスターの脳内に接種したところ 576.8+127.8 日(4/4)で伝達した。脳内では前頭葉と頭頂葉に多く分布していた(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 プリオンの脳内投与による感染実験を行った。Hu129V/V マウスでも 5 頭中 4 頭が 733±10 日の潜伏期間で発症した。組織学的にはアミロイド斑がみられその後シナプス型のプリオン沈着がみられる傾向があった(北本)。BSE/JP24 佐世保非定型 BSE プリオンを脳内接種したカニクイサル 2 頭は 1 年 7 ヶ月で神経症状が出現し、その 4 ヶ月後に安楽死を行った。加速歩行から不随意運動、ミオクローヌス、運動失調、麻痺が進行し起立困難となった。MRI では脳室拡大と大脳皮質の萎縮、T2 画像で小脳が全体に高信号を示した。病理所見は典型例や継代例の病理所見と異なり、vCJD にみられるものとは全く異なっていた(柴田)。

3) 食肉検査における高感度検出法の開発

非定型 BSE プリオンの高効率試験管内増幅は昨年 の 10 倍、 10^4 まで増加した。定型 BSE 接種後発症したカニクイサル (vCJD 動物モデル) 由来のプリオンは 4 回の増幅により 10^{10} 希釈まで増幅できた。サル由来の臓器組織や髄液、リンパ球分画からも検出できた (村山)。アミロイド線維の検出試薬として用いられるチオフラビン T 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た Real-time QUIC 法で BSE プリオンが増幅できるようになったがさらに検討が必要であった (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。関係機関との調整がやっとついたので、成果は最終年度にまとめて報告する。

D. 考察

これまでの BSE プリオンの動物への伝達試験は数名の研究分担者で行い、その暫定結果について表にまとめた。いまだ実験は継続中なので、今後データは追加変更されていく。しかし、これでおおよそ明らかになったのは、非定型 BSE プリオンはこれまでの定型 BSE プリオンと異なっていることである。すなわち、非定型 BSE プリオンは野生型マウスには伝達せず、ウシ型 Tg マウスやウシ、サルにはより短い潜伏期間で伝達する。その病理像も定型 BSE プリオン接種動物とは異なっている。つまり、サルでは定型 BSE プリオン接種によりヒトの vCJD ときわめて類似する病理像を示し、継代サルでも同様であったが、非定型 BSE プリオン接種によりヒトの sCJD と類似する所見を示した。WB のパターンはもとも

とのパターンとおおよそ類似している。ただしこれらの所見はすべて脳内接種により得られた結果であるので、慎重な解釈が必要であろう。次年度には経口感染例の発症を期待したい。

高感度プリオン検出法として、PMCA 法および realtime QUIC 法が使えるようになってきている。先行した PMCA 法は定型 BSE プリオンの増幅は可能であるが、非定型 BSE プリオンについては、あと一年はかかるかもしれない。しかし、定型 BSE プリオンを接種したサルでは髄液や血液からも検出できたので、vCJD 動物モデルとしての解析が十二分に行えると思われる。realtime QUIC 法は信頼性のあるデータを得るにはあと一年は必要であろう。今後はどのような使い方が可能かどうか、どの程度の感度があればいいのか、実際の検査に応用することができるかなどの検討も同時に進めてもらいたい。

プリオンの増殖等に関連する宿主因子の検討が行われ、LPR1 と Peripherin が候補となった。見つけるまでにはかなり多くの実験を要したが、今後の性状解析が期待される。

E. 結論

非定型 BSE が定型 BSE と性状が異なり、定型 BSE に比べて病原性が高いことが明らかとなった。非定型 BSE は近交系マウスには伝達しなかったが、サルは定型 BSE 例と比べて半分の潜伏期間で発症し、定型 BSE を接種したサルとは異なる病理所見を示した。非定型 BSE は定型 BSE と異なる宿主感受性を示した。脳内発現サイトカインの役割はプリオン病の病態においてきわめて限定的であった。牛回腸ループに投与した組換えマウスプリオンタンパク質は M 細胞のドームや粘膜下組織で樹状

細胞やマクロファージに取り込まれた。プリオン
の取り込みに関与する Peripherin を同定し、
プリオン病の進行と病態に影響する可能性
を見いだした。またプリオン産生に影響す
る宿主因子として LRP1 を同定した。vCJD プ
リオンをヒト型 129V/V ノックインマウスに
腹腔内投与しても脾臓に沈着はみられなかつ
たが、脳内投与では高率に感染しプリオン沈
着がみられた。PMCA 法で非定型 BSE プリ
オンはある程度増幅でき、また定型 BSE プリ
オン接種サル由来のプリオンも十分増殖でき
るようになった。Realtime QUIC 法を開発し定
型 BSE プリオン増殖が可能となった。

F. 健康危険情報

とくになし

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. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

我が国で摘発されたBSEの伝達試験(脳内接種)のまとめ(平成22年1月現在)

BSEコホート	動物への伝達試験	マウス	ウシTgマウス	ウシ	サル	その他
1992年産 JP24(佐世保) 非定型、肉用種	伝達*	C57B6, RIII, S.JL, ICR 不成功	TgboPrP KiBoPrp (197-152d)	ホルスタイン (331-497d) 和牛 (505d)	カニクイ (700-800d)	ハタネズミ (不成功) モルモット (1100d観察中)
1995-6年産 JP1-7(神奈川等) 定型、乳用種	伝達	C57B6, RIII, I/LnJ, ICR (1st 350- 600d 2nd: 180d)	TgboPrP boTg39 (280d)	ホルスタイン (589-757d) JP5/6	カニクイ JP6和歌山 (1st:1100- 1700d 2nd:582- 682d)	モルモット (330-360d) スナネズミ (780d) アルメニアソハム スター (400-600d) シリアソハムスター、 ラット (不成功)
1999-2000年産 JP12(熊本) 定型、乳用種	伝達*	C57B6, RIII, S.JL, (1st 350- 600d 2nd: 180d)	ND	ND	ND	ハタネズミ (不成功)

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、定型および非定型 BSE プリオン感染牛を作出するとともに、非定型 BSE の発症前および臨床症状を認めた非定型 BSE 牛におけるプリオン脳内分布について検討した。非定型 BSE (BSE/JP24) を脳内接種し、BSE プリオン感染牛を作出した。接種後 9 ヶ月では臨床的な変化はなかったが、脳幹部、視床などに PrP^{Sc} が検出された。接種後 11 ヶ月に臨床症状の変化を示す牛が出現し、接種後 16 ヶ月で脳全域より PrP^{Sc} が検出された。

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 36 例の BSE 患畜が 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 患畜が非定型 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 患畜においては、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。

本年度は定型および非定型 BSE プリオン感染牛を作出するとともに、発症前および発症後のプリオン脳内分布を明らかにする。

B. 研究方法

当場で出生し、離乳した生後 4 カ月の黒毛和種雌子牛 6 頭を用いた。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 20 年 5 月に脳内接種した 8 頭 (表 1) のうち非定型 BSE 患畜脳を接種した 5 頭について、2 頭を接種後 9 ヶ月、3 頭を接種後 16 ヶ月で病態解析のため試験殺の上病理解剖を行う

た。

表1 平成20年5月に脳内接種したBSEプリオン接種牛の経過

No	品種	接種材料	観察期間(月)	臨床症状
4768	Hol	BSE/JP24	9	—
5652	Hol	BSE/JP24	9	—
0791	Hol	BSE/JP24	16	+
6048	JB	BSE/JP24	16	+
6079	JB	BSE/JP24	16	+
0947	Hol	BSE/UK	(2010年2月解剖予定)	
5621	Hol	BSE(-)	観察中	(2010年2月現在)
5966	JB	BSE(-)	観察中	

Hol: ホルスタイン種、JB: 黒毛和種、BSE/JP24: 非定型BSE、BSE/UK: 定型BSE

BSEプリオン感染牛の病理解剖は、動物衛生研究所プリオン病研究センターのABSL3施設内において行った。鎮静および麻酔下において、当該牛を放血によって安楽殺した。病理解剖時に各組織および血液、脳脊髄液を採取した。採取した組織は、生化学検査用に-80℃、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プリオン感染牛から採取した脳において、18カ所(図1)を切り出し、ウエスタンブロット(WB)用試料とした。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。

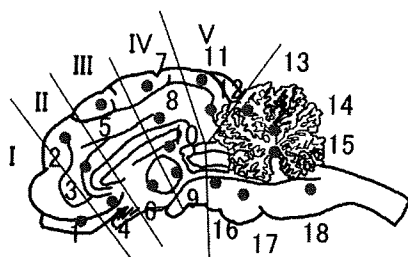


図1 脳組織の採材部位

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

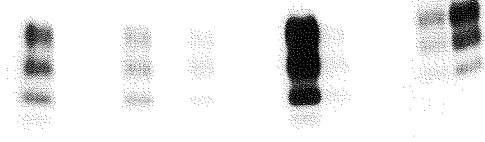
1) BSEプリオン感染牛の作出

平成20年5月に脳内接種し接種後16ヶ月まで観察した非定型BSEプリオン接種牛3頭のうち、1頭(No.6079)に、時折音に過剰反応する、群から離れる、採血時に抵抗する、などの臨床上的変化が接種後11ヶ月より観察された。歩様の異常は見られなかった。解剖直前に1頭(No.0791)が起立困難になり、他の2頭も四肢の震えが観察された。

2) 定型および非定型BSEプリオン感染牛のプリオン体内分布

WB法により、臨床症状を呈さない接種後9ヶ月の非定型BSEプリオン接種牛2頭において、脳幹部を中心に小脳、視床、海馬および線条体などにPrP^{Sc}の蓄積がみられた(図2)。臨床症状を認めた接種後16ヶ月非定型BSEプリオン接種牛では脳全域にPrP^{Sc}の蓄積がみられた(図3)。今回解析した5頭すべてにおいて、検出されたPrP^{Sc}は、1糖鎖型が優位であった。黒毛和種とホルスタイン種による病態の差異は認められなかった。

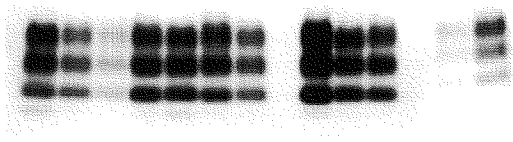
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 マウス陽性対照
1.6 6.4 (μg)



抗体: T2-HRP
露光: 2分間

図2 No.4768 (接種後9ヶ月)のWB法によるPrP^{Sc}脳内分布解析
(各レーンの検体No.は図1参照)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 マウス陽性対照
1.6 6.4 (μg)



抗体: T2-HRP
露光: 3分間

図3 No.6079 (接種後16ヶ月)のWB法によるPrP^{Sc}脳内分布解析
(各レーンの検体No.は図1参照)

D. 考察

脳内接種による非定型BSE (BSE/JP24) プリオン感染牛において、接種後9ヶ月で脳幹部などにPrP^{Sc}が検出され、接種後11ヶ月に臨床上的変化を現す牛が出現など、非定型BSE (BSE/JP24) プリオンは、従来型BSEより、牛に対する病原性が高いことが示唆された。検出されたPrP^{Sc}のバンドパターンは1糖鎖型優位であり、接種材料であるBSE/JP24のバンドパターンと同様であり、BSE/JP24の性状を保持していると考えられた。

E. 結論

以上のように、非定型BSE (BSE/JP24) プリオンは従来型BSEプリオンに比べ、高い病原性を示し、また検出されるPrP^{Sc}は接種材料の性質を保

持している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol Immunol.* 2009 Dec;53(12):704-7.
- 2) Arai S, Matsui Y, Fukuda S, Okada H, Onoe S. Brainstem auditory evoked potentials in experimentally-induced bovine spongiform encephalopathy. *Res Vet Sci.* 2009; 87 (1) :111-4.

2. 学会発表

福田茂夫他「BSEプリオン脳内接種牛の延髄における異常プリオン蛋白質の蓄積動態」2008年プリオン研究会。宮城県蔵王。2009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

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 菅原 盛幸 (日本獣医生命科学大学)
坂口 翔一 (帯広畜産大学)
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 1) これまでに行ったプリオン感染脳内におけるサイトカインのプロファイリングの結果に基づき、入手可能なこれらサイトカイン欠損マウスにスクレイピー帯広株を接種し、潜伏期、病態について検討を行った。IL-12a および-b、IL-12b のレセプターである IL-12rb2、CCL2 およびそのレセプターである CCR2 の 5 種類の欠損マウスを用いた。このうち、IL-12a および-b、IL-12rb2 欠損マウスでは潜伏期の短縮、CCL2 では延長がみられ、いずれも病態の制御や促進に一定の役割を果たしていることが推察されたが、他のサイトカインの発現状況やこれら潜伏期の程度から、その働きはきわめて限定的であると考えられた。2) 非定型 BSE の伝達をマウス、ハタネズミ、モルモットで試みたが、伝達ができなかったこともあり、BSE 伝達動物との比較病理学的性状解析には至らなかった。しかしながら、BSE 感染モデルおよび BSE 牛では興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸によるシナプス伝達を強く阻害していることが確認され、プリオン感染動物の臨床像やプリオンの脳内病変の広がりといった病態理解の手がかりとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

およそ 150 日を病末期とするマウス馴化スクレイピー帯広株を脳内に接種し経時的なサイトカインの探索を行ったところ、接種後 90 日頃よりさまざまなサイトカインの発現がみられた。スクレイピー帯広株では接種後 90 日目より脳組織における PrP^{Sc} の蓄積、アストログリアとミクログリアの活性化がみられ、さらに免疫組織化学的にもいくつかのサイトカインが PrP^{Sc} の蓄積部位に一致して発現が確認されたことから、これらサイトカインの病態形成への関与が示唆された。しかしながら、発現しているこれらサイトカインが病態の形成や進行にどのような役割を果たしているのかは依然明らかでない。そこで本研究では、これらサイトカインの発現を欠損させたマウスに帯広株を接種し、潜伏期と病態を検討することでその役割の一端を明らかにすることを目的とした。

また、本研究では本邦における非定型 BSE (JP24) の発生を受けて、実験動物への伝達と性状解析の一端として定型 BSE との比較病理学的解析を行うことを計画した。しかしながら、後述す

るようにマウス、ハタネズミ、モルモットの 3 種類の野生型動物への伝達はすべて陰性を示したことから、比較病理学的解析のために予定していた神経伝達物質のマーカーを用いた病理学的解析を、BSE プリオンの性状を明らかにすることを目的として、感染モデルおよびサーベイランスにより摘発された BSE に対して実施したので、その概要を報告する。

B. 研究方法

1) プリオン感染脳内の免疫学的解析

C57BL/6 を野生型マウスとする欠損マウス (IL-12a, IL-12b, IL-12rb2, CCL2, CCR2) を Jackson Lab (USA) より購入し、マウス馴化スクレイピー帯広株 10% 脳乳剤を脳内接種し、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。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 あるいは 12F10 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 GFAP 抗体、抗 Iba1 抗体による IHC 法を実施した。

2) 非定型 BSE の性状解析

国立感染症研究所より分与されたと畜場で摘発された非定型 BSE (JP24) の 10%脳乳剤と対照として定型 BSE (JP10) をマウス (ICR、クレア、♀、4 週齢)、ハタネズミ (日本獣医生命科学大学菅原先生より分与された) およびモルモット (Hartley、SLC、♀、3 週齢) に脳内接種を行い、経過観察を行い、病末期あるいは死亡個体に対し解剖を行った。また、BSE 材料としてと畜場で摘発された定型 BSE (JP4) の門部分の病理組織材料を用いた。対照材料として BSE 確定検査陰性牛の門部分を用いた。

作製した病理切片に対して、抗プリオン抗体として 12F10 抗体、グルタミン酸のマーカーとして抗 VGLUT1 抗体および抗 VGLUT2 抗体、GABA のマーカーとして抗 VGAT 抗体を用い、蛍光抗体による二重染色を含む免疫染色を行った。

(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

1) プリオン感染脳内の免疫学的解析

いずれのサイトカイン欠損マウスについても発症が確認された。潜伏期については図 1 に示した。

野生型である C57BL/6 では平均 162 日前後で発症するのに対して、IL-12b, IL-12a, およびそのレセプターである IL-12rb2 欠損マウスでは程度の差はさまざまであるが、潜伏期の短縮が観察された。これに対して、CCL2 欠損マウスでは潜伏期の延長がみられた。病末期における海馬を含む大脳および小脳における PrP^{Sc} の蓄積量や染色パターンには違いはみられなかった (図 2)。CCR2 欠損マウス以外ではこれら蓄積部位に対して多数のアストログリアおよびミクログリアの集積と突起を伸展させた活性化が観察された。一方、CCR2 欠損マウスではミクログリアの数的な増加は観察されたが、突起の伸展はほとんどみられず活性化の所見は得られなかった。また、同様にアストログリアの活性化についても比較的軽微であった

(図 2 および表 1)。

2) 非定型 BSE の性状解析

伝達を試みた動物の病理学的解析により定型 BSE はマウス、ハタネズミおよびモルモットについては伝達可能であったが、非定型 BSE はこれら動物に対して伝達できなかった (表 2)。これについては異なる実験動物への伝達を実施して、再度検討を加える予定である。

BSE が伝達可能であったモルモットおよび定型 BSE の性状解析の一端として神経伝達物質に対するマーカーを用いて、その動態について病理学的に解析を行った。BSE 伝達モルモットではプリオンの蓄積に伴う分子層および顆粒層の脱落による小脳皮質の萎縮を特徴とすることから、本研究では小脳および脳幹部を中心に検索を行った。

対照非感染モルモットでは、小脳分子層において VGLUT1 陽性シナプスがプルキンエ細胞樹状突起を中心にびまん性に強い陽性反応を示し、VGLUT2 陽性シナプスおよび VGAT 陽性シナプスでは比較的太い樹状突起に沿って陽性が観察された (図 3)。一方、BSE 伝達モルモットでは小脳顆粒層から分子層にかけてプリオン沈着が観察された。これら部位における VGLUT2, VGAT の陽性所見は対照動物と同様であったが、VGLUT1 陽性シナプスの顕著な減少がみられた (図 4)。同様に、VGLUT2 および VGAT がそれぞれ強く陽性を示すオリブ核、小脳核では対照に比較してシナプスの顕著な減少は確認できなかった。また、対照動物では VGLUT1 が強い陽性を示す橋核において感染動物では顕著な減少がみられた (図 5)。対照牛では VGLUT1、VGLUT2, および VGAT がそれぞれ孤束核、オリブ核、網様体に陽性を示したが、BSE 牛では孤束核の VGLUT1 陽性シナプスの顕著な減少が観察された (図 6-8)。

D. 考 察

1) プリオン感染脳内の免疫学的解析

すでに報告したように、サイトカインアレイを用いた 32 種類のサイトカインの感染に伴う脳内の発現結果では、90 日より IL-12 の発現がみられ、120、150 日と経過に従いシグナルの増強がみられた。MCP-5、sTNF α の発現は 120 日目にみられ、150 日目では強いシグナルがみられ、また、CCL2、RANTES、TIMP-1 は 150 日目で発現が確認されている。これらのうち、レセプターを含め入手可能

であった欠損マウスでの潜伏期の結果から、IL-12 およびそのレセプターである IL-12rb 欠損マウスでは潜伏期の短縮がみられたことから、これらサイトカインは発症の進行に抑制的に働くことが示唆された。IL-12 は感染により誘導され、IL-2 の存在下で IFN- γ などの産生を促す一方、IL-10 などにより産生が抑制されることが知られているが、サイトカインアレイ上では IFN- γ 、IL-2 や IL-10 の産生は観察されていない。IL-12 およびそのレセプターである IL-12rb 欠損マウスではともに同様の結果が得られたことから、これらサイトカインが病態の制御に何らかの役割を果たしているものと考えられた。一方、IL-10 欠損マウスでは chandler 株に対して、潜伏期の顕著な短縮がみられ、IL-10 が病気の進行に抑制的に働くことが報告されている。しかしながら、IL-10 からみたカスケードの中では説明がつかないことや潜伏期についてもその程度が限定的であったことから、今回検索したこれらサイトカインの病態制御として果たす役割はきわめて限定的であると考えられた。一方、アルツハイマー様疾患モデルマウスの CCR2 欠損型マウスではミクログリアの集積の減少と病気の進行が促進することが知られ、CCR2 によるミクログリアの集積が A β の除去に貢献することが報告されている。本研究で示したようにプリオン感染 CCR2 欠損マウスでは病末期でのミクログリアの活性化は確認されず、野生型マウスと潜伏期に違いはみられなかった。これらのことからプリオン感染動物では CCR2 は病態の制御には直接関与しない可能性とアルツハイマー病とは脳内の免疫学的機序が異なることが示唆された。また、CCL2 欠損マウスでは潜伏期の延長がみられ、CCL2 は発症の進行に促進的に作用することが示唆された。CCL2 はミクログリアに発現し、アストログリアやミクログリアの反応性や浸潤性に関与することが知られている。このことから、これら細胞の活性化が変性性病変の進行に促進的に働く可能性が示唆されたが、今回検索した他のサイトカインと同様カスケードの一端を担う可能性はあるものの、その機能はきわめて限定的と考えられた。

2) 非定型 BSE の性状解析

以前報告したように、BSE 接種モルモットでは分子層と顆粒層の顕著な萎縮からなる特徴的な病変が小脳に観察され、これら病変に一致してプリオンの蓄積がみられる。この感染モルモットおよび BSE 牛についてグルタミン酸興奮性伝達物

質のマーカーとして VGLUT1、VGLUT2、GABA 抑制性伝達物質として VGAT を用いて、BSE プリオンの性状解析の一端としてプリオンによる影響を検討したところ、いずれも VGLUT1 シナプスの選択的な減少が確認された。VGLUT1 および VGLUT2 はいずれも小胞膜グルタミン酸トランスポーターであるが、その発現ニューロンが異なり、前者は小脳顆粒細胞を起源とする平行線維終末が陽性を示し、後者はオリブ核ニューロンを起源とする登上線維終末が陽性を示す。また、本研究により VGLUT1 は橋核や小脳核においても陽性を示し、感染動物や BSE 牛では同様に陽性シナプスの選択的な減少が観察された。プリオン感染脳ではプリオンの蓄積に伴いシナプスの減少がみられ、ニューロンの変性変化が引き起こされることが示唆されている。今回の結果から、プリオンの蓄積に伴い感染モルモット、BSE 牛では VGLUT1 陽性シナプスが選択的に侵され、シナプスの崩壊・消失、しいてはニューロンの変性変化をもたらす可能性が示唆された。今後、他の神経伝達物質の検討とともに、大脳を含めた部位での解析を進める必要があると考えられた。

E. 結 論

今回検索したサイトカインのうち、IL-12、IL-12rb、CCL2 はプリオン病の病態の制御、促進に一定の役割を果たしていることがわかったが、その機能はきわめて限定的であると考えられた。興奮性神経伝達物質グルタミン酸のマーカーである VGLUT1 陽性シナプスの選択的な脱落が BSE プリオン感染動物および BSE 牛に観察された (図 8)。BSE プリオン性状の一端と考えられたが、さらなる神経伝達物質の検討は臨床症状を含めた病態を説明する可能性がある。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M.: Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol.*, 83(11):5918-5927 (2009)
- 2) Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M.: Generation of

monoclonal antibody that distinguishes PrPSc from PrPC and neutralizes prion infectivity. *Virology*. 394(2):200-207 (2009)

2. 学会発表

- 1) Song CH, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. : Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. NeuroPrion 2009, September 2009, Thessaloniki, Greece.

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