

2010330017A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23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22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

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

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	北海道立総合研究機構畜産試験場・畜産工学グループ	研究主任
古岡 秀文	帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門	教授
小川 晴子	帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門	准教授
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	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	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	上席研究員
新 竜一郎	長崎大学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・応用獣医科学講座	教授
堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科	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 22 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	11
研究分担者：福田 茂夫（北海道立総合研究機構 畜産試験場・畜産工学グループ）	
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	15
研究分担者：古岡 秀文（帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門）	
小川 晴子（帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門）	
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	19
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	29
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	33
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	39
研究分担者：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）	
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	45
研究分担者：村山 裕一（動物衛生研究所・プリオン病研究センター）	

9. 食肉検査における高感度検査法の開発	49
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	53
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 (プリオン感染 CD14 遺伝子欠損マウスにおける病態解析)	57
研究分担者：堀内 基広（北海道大学大学院・獣医学研究科）	
12. CWD のサーベイランスとシカ PrP 遺伝子型の調査	63
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	67
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	71

1. 総括研究報告書

平成22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た。脳内接種による種々の動物伝達試験では、非定型 BSE は定型 BSE に比べて潜伏期間が短いことが明かとなった。非定型 BSE は近交系マウスには盲継代してもまた他の小動物にも伝達しなかったが、牛や牛プリオン遺伝子組換えマウスや初回接種のサルは、定型 BSE 例と比べても半分の潜伏期間で発症し、しかも異なる病理所見を示した。つまりヒトでみられた花弁状プリオン斑は定型 BSE 接種サルにはみられたが、非定型 BSE 接種サルでは sCJD 様のプリオン沈着がみられた。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。また腸管でのリンパ系細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播を想定し、培養細胞間でのプリオンの伝播機構を解析した結果、プリオン感染マウスの脾臓細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播は低率ながら起きることが示唆された。プリオンの取り込みに関与する宿主因子 Peripherin を同定し、細胞内へのプリオン取り込みを増強させること、また Peripherin 過剰発現遺伝子組換えマウスへの BSE 由来プリオン接種実験では病期の短縮が認められた。またプリオン産生に影響する宿主因子としていくつか同定し特異性を確認した。高感度検出法として、PMCA 法では非定型 BSE プリオンの増幅が可能となり、また定型 BSE プリオン接種したサル由来のプリオンも十分増殖でき、髄液や血液といった生前の検体からでも検出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。北海道の鹿専用の簡易と殺場で延髄の採材を行うためのマニュアルを作製し、CWD のサーベイランスを実施したところ、道内で捕獲された計 70 頭のエゾシカは全例陰性で、PrP 遺伝子多型はみられなかった。以上のことから、初期の研究目的をほぼ達することができた。

研究分担者：

福田茂夫（北海道立総合研究機構畜産試験場・畜産工学グループ・研究主任）

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・応用獣医科学講座・教授）

堂浦克美（東北大学大学院・医学系研究科・プリオン病学・教授）

古岡秀文（帯広畜産大学・基礎獣医学部門・獣医病理学・教授）

小川晴子（帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門・食品衛生学分野・准教授）

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）

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）

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）

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・上席研究員）

新竜一郎（長崎大学医歯薬学総合研究科・感染分子解析学助教）

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、その後の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パ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の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

非定型 BSE (JP24) プリオン接種後 11 ヶ月で中枢神経系に加えて視神経や顔面神経に、接種後 16 ヶ月で腕神経叢、肩甲上神経などの末梢神経系に PrP^{Sc} が検出され、定型 BSE に比較し、早期に PrP^{Sc} の末梢神経系への伝達が起こることが明らかとなった。これらの PrP^{Sc} は、中枢神経系から遠心性に伝播したと考えられた。定型 BSE と同様に、リンパ組織、筋肉などからは PrP^{Sc} は検出されず、神経系組織以外への伝播の可能性は低いと考えられた。黒毛和種における非定型 BSE プリオン接種試験では、潜伏期間が 418±56 日で、ホルスタイン種とほぼ同様で、定型 BSE よりも早期に臨床的な行動変化が出現する(福田)。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、伝達できなかった。BSE 感染モデルおよび BSE 牛の小脳および脳幹部では、グリア細胞、プルキンエ細胞に発現する細胞膜グルタミン酸トランスポーター (EAAT1、

EAAT4) を検索したところ、グリア細胞の活性化に伴い EAAT1 の発現が強くみられ、また EAAT4 の腫大・変性が確認された。一方、ドーパミン、セロトニン、サブスタンス P のうち、ドーパミンの発現が特に大脳で顕著にみられた(古岡)。非定型 BSE (JP24) の病原体の性状解析・株化を目的として、近交系マウス 3 系統 (C57BL/6J、SJL、RIII) への伝播実験を行った。初代伝播実験では被接種マウスにプリオン病発症の外見所見や脳組織の空胞化は認められず、また生化学(ウエスタンブロット)ならびに免疫組織化学分析においても PrP^{Sc} の明らかな蓄積は検出できなかった(飼育最長日数: C57BL/6J=844 日、SJL=528 日、RIII=850 日)。マウス脳ホモジネートを同系マウスへ 2 代目接種して継続観察した。この 2 代目伝播実験の結果、被接種 SJL (最長経過観察期間=接種後 591 日目) も RIII (最長経過観察期間=接種後 827 日目) も発症の兆候を呈しなかった(萩原)。牛海綿状脳症プリオンの侵入部位とされる牛腸管のリンパ系組織の増殖・分化過程を各種 CD 抗原とサイトカインレセプターの発現から解析した。その結果、初生牛にくらべて 2 ヶ月齢牛において免疫系組織が発達しながら外部から抗原を旺盛に取りこみ分化成熟する過程が免疫組織化学で確認された。腸管でのリンパ系細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播を想定し、培養細胞間でのプリオンの伝播機構を解析した。その結果、プリオン感染マウスの脾臓細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播は低率ながら起きることが示唆された(石黒)。プリオン感染に感受性および非感受性培養細胞株の比較検討から、両細胞間で発現に差異のある

Peripherin を同定した。Peripherin 高発現培養細胞および Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウスを用いたプリオン感染実験を行い、プリオン感染に与える Peripherin の影響について解析した。培養細胞を用いた検討から Peripherin はプリオン感染成立に直接の影響を与えなかったが、細胞内へのプリオン取り込みを増強させる事が示唆された。また、Peripherin 過剰発現トランスジェニックマウスへの BSE 由来プリオン接種実験では病期の短縮が認められた (佐多)。CD14 欠損(CD14^{-/-})マウスでは、プリオン株を接種した場合、有意に生存期間が延長することから、特にミクログリアを中心に CD14^{-/-}マウスの脳における病態を解析した。感染後 60-90 日では、抗炎症性サイトカインの IL-10 および TGF- β は主にミクログリアと思われる CD11b⁺陽性細胞が産生していた。感染後 120 日になると、ミクログリアに加えて神経細胞でも産生が認められたが、アストロサイトでは産生が認められなかった。プリオン感染 CD14^{-/-}マウスでは、WT マウスよりも早期から抗炎症性サイトカインである TGF- β や IL-10 の発現が亢進しており、生存期間が延長することから、CD14 分子はミクログリアの活性化や抗炎症性サイトカイン産生の制御、および抗炎症性サイトカインに対する応答の制御を通じてプリオン病の病態進行に関与すると考えられた (堀内)。異常型プリオン蛋白(プリオン) の産生に影響する宿主因子の同定を目指して、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析により、新規ターゲットとして “Sparcl1 (Hevin)” を見出した。しかし、オフターゲット効果が疑われたため、

新たな DNA マイクロアレイ解析を行って “Sctr” を見出した。Sctr やその関連する因子の遺伝子ノックダウンやサイレンス変異を導入した発現ベクターによるレスキュー実験などによってその特異性を確認した (堂浦)。

2) 種の壁のメカニズムの解明

BSE/JP24(L-BSE)プリオンを伝達したハムスターの初代の潜伏期は 576.8 日 (発病率:75%) であったが、2 代目では 208 日 (発病率:100%) に短縮した。PrP^{Sc} の脳内での蓄積パターンおよび PrP^{Core} の分子量はハムスター馴化 C-BSE プリオンと異なっていたが、空胞変性の分布およびプロテイナーゼ K 抵抗性 PrP 領域(PrP^{Core})の糖鎖型は、C-BSE プリオンと類似していた。ハムスターに継代した L-BSE プリオンの一部の性状は C-BSE と類似したことから、非定型 BSE の不安定性が示唆された (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ている。昨年明らかになったコドン 129 V/V のヒト型ノックインマウスで高率に感染することから、129 V/V のヒトが vCJD になったときの診断法を確立する必要性がでてきた。そこで、ウシ型のノックインマウスを用いて vCJD の診断法を開発した (北本)。カニクイザルへの C-BSE 継代接種では、初代接種の潜伏期が 27~44 ヶ月であるのに対し、13~15 ヶ月と 1/2~1/3 に短縮され、再現性の高い vCJD 早期発症モデル系ができた。L-BSE 初代接種カニクイザルでは潜伏期 19 ヶ月と C-BSE 初代接種に比べ短かった。臨床症状は C-BSE 接種群では驚愕反応等、行動異常が先行して認められたのに対し、L-BSE 接種群ではミオクローヌ

スが先行し症状が進行していった。ウエストンブロッティングによる蛋白解析では C-BSE 接種群では初代、継代群とも (BSE JP/6) 感染牛脳と同様のパターンを示した。L-BSE 接種群の glycoform profile は C-BSE 接種群と異なり、L-BSE 感染牛脳と同様のパターンであった。安楽死直後の MRI 画像では著しい脳室の拡大を伴い、顕著な萎縮が認められた。病理学的所見においては C-BSE 接種群で PrP^{Sc} の花弁状沈着が認められたのに対し、L-BSE 接種群では PrP^{Sc} は薄く細顆粒状に存在し、明らかなブラークの形成は認められなかった。いずれの群も顕著な空胞変性が観察され、特に、L-BSE 接種群において、空胞領域の増大が顕著であった (柴田)。

3) 食肉検査における高感度検出法の開発

非定型 BSE PrP^{Sc} の高効率試験管内増幅法として、デキストラン硫酸化合物を用いた PMCA 法を非定型 BSE 由来の牛 PrP^{Sc} の増幅に応用したところ、バイオアッセイを上回る感度で非定型 BSE 牛 PrP^{Sc} が検出可能になった。また、昨年度までに開発したカニクイザル PrP^{Sc} の超高感度検出法を用いることで、vCJD 霊長類モデルにおける脳脊髄液や血液を用いた生前診断が可能となった (村山)。BSE 由来異常型プリオンタンパクの高感度検査法を開発するため、ヒトプリオン病に対して確立した高感度検査法 (Real-time QUIC 法) を BSE に対して最適化するための条件検討を行ってきた。感度の向上はみられたが、現時点での感度は依然実用レベルには達していないため、今後さらに別の条件を検討し、最適化を図る (新)。

4) 食用となるシカの CWD リスク評価

鹿科動物の慢性消耗病 (Chronic wasting disease, CWD) は、我が国での発生報告はない。しかし、鹿肉はゲームミートとして人に食されること、北海道ではエゾシカ肉の活用を推進していること、鹿の臓器はペットフードに利用されることから、CWD が食を介してヒトに感染、あるいは動物種間を超えて伝播する懸念が絶えない。我が国の鹿科動物における CWD の存在の有無を調べるために、北海道の鹿専用の簡易と殺場で延髄の採材を行うためのマニュアルを作製し、CWD のサーベイランスを実施した。道北、道東、道央で捕獲された計 70 頭のエゾシカの延髄から PrP^{Sc} の検出を行ったが、全例陰性であった。また、計 10 頭のエゾシカの PrP 遺伝子多型を解析したが、アミノ酸型は ²⁰Asp⁹⁵Gln⁹⁶Gly¹⁰⁰Ser¹¹⁶Ala¹³²M²²⁵Ser²²⁶Gln であり、アミノ酸多型は認められなかった。

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、その最終年度の結果について表にまとめた。これで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 WB の糖鎖パターンのみならず、動物への伝達試験の結果でも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盲継代しても伝達せず、ウシ型 Tg マウスやウシ、サルには定型 BSE 接種動物よりも短い潜伏期間で伝達することが明かである。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継代したサルでも示した。非定型 BSE プリオン接種により空胞変性が強く、vCJD に特徴的な花弁状プリオン班はみられず、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よそ類似した。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。

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。後者は感度の点で改良が必要である。先行した PMCA 法は定型 BSE プリオンおよび本年度の研究から、非定型 BSE プリオンについても可能となった。さらに、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、カニクイサルは vCJD 動物モデルとしての解析が十二分に行え、有用なモデルとなると思われる。ただし、継代がやや不十分なのでその病態の固定にはさらに時間がかかるかもしれない。realtime QUIC 法は信頼性のあるデータを得るには今後一年は必要であろう。両者ともに検出時間はかかるが、感度はかなり高いので、かえって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、また研究のみならず、実際の検査にどのように応用していったらよい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、いくつか同定できた。これらの病態に関わる意義とどのように応用するかについての検討はさらに必要で、今後の研究の発展が期待される。

ようやく CWD の検査体制を整えることができ、成果も得られた。継続的に検査を

行い、そのモニタリングを進めていくべきであろう。

E. 結論

研究期間の最終年度までに、非定型 BSE プリオンが定型 BSE とは生化学的そして伝達試験においても性状が異なり、定型 BSE に比べて潜伏期間が短く、病変が高度であることから、病原性が高いことが考えられた。脳内接種したサルは定型 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。PMCA 法で非定型 BSE プリオンも増幅でき、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ため、髄液や血液検体で生前診断が可能となった。Realtime QUIC 法は、感度はやや不十分であるものの定型 BSE プリオンの増殖が可能となった。並行して両者の使い方も検討が必要である。ほかの研究分担者の成果も予定通り得られた。成果については各分担報告を参照されたい。

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23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, SJL, ICR 不成功	TgboPrP KiBoPrp (197-152d)	ホルスタイン (331-492d) 和牛 (469-505d)	カニクイ (700-800d)	ハタネズミ (不成功) モルモット (不成功)
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) アルメニアンハム スター (400-600d) シリアンハムスター、 ラット (不成功)
1999-2000年産 JP12(熊本等) 定型、乳用種	伝達*	C57B6, RIII, SJL, (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 北海道立総合研究機構 畜産試験場 基盤研究部
研究協力者 陰山 聡一 (北海道立総合研究機構 畜産試験場 基盤研究部)
横山 隆 (動物衛生研究所 プリオン病研究センター)
岡田 洋之 (動物衛生研究所 プリオン病研究センター)

研究要旨 脳内接種による定型および非定型 BSE プリオン感染牛を用い、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、両者のプリオン体内分布を比較検討した。非定型 BSE プリオン接種後 11 ヶ月で中枢神経系に加えて視神経や顔面神経に、接種後 16 ヶ月で腕神経叢、肩甲上神経などの末梢神経系に PrP^{Sc} が検出され、定型 BSE に比較し、早期に PrP^{Sc} の末梢神経系への伝達が起こることが明らかとなった。これらの PrP^{Sc} は、中枢神経系から遠心性に伝播したと考えられた。定型 BSE と同様に、リンパ組織、筋肉などからは PrP^{Sc} は検出されず、神経系組織以外へ PrP^{Sc} が伝播する可能性は低いと考えられた。黒毛和種における非定型 BSE プリオン接種試験では、潜伏期間が 418±56 日で、ホルスタイン種とほぼ同様であり、定型 BSE よりも早期に臨床的な行動変化が出現することが認められた。

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、当初は単一の BSE プリオンに起因すると考えられてきたが、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 が多数報告されている。定型 BSE プリオンとの分子量の比較から非定型 BSE には H 型と L 型が存在し、そのほとんどは高齢牛で発見されている。国内においては、これまでに 36 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 (BSE/JP24) の BSE 患者が非定型 BSE であると報告されている。BSE/JP24 については、L 型の性状であることが明らかとなっている。我々はこれまでに BSE/JP24 プリオンの牛への脳内接種により、定型 BSE よりも PrP^{Sc} の蓄積が早期に起こり、早く発症することを明らかにしてきた。非定型 BSE の起源および感染経路は未だ不明であり、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病のように弧発性である可能性も考えられることから、非定型 BSE における牛での病原性やプリオンの体

内分布を明らかにする必要がある。

我が国の BSE 患者においては、黒毛和種が 4 例含まれ、うち 1 例は非定型 BSE (BSE/JP24) であった。また非定型 BSE の多くが高齢牛で発生していることから、飼養期間の比較的長い黒毛和種における非定型 BSE の病態について明らかにする必要がある。

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ことを目的とした。

本年度は非定型 BSE プリオン感染牛のプリオン体内分布を解析し、定型 BSE プリオン感染牛のそれと比較検討した。

B. 研究方法

1) 非定型 BSE におけるプリオン分布の解析
ホルスタイン種 (n=5) を用い、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) 10%感染脳乳剤 1ml を脳内接種した。専用隔離牛舎 (ABSL1) にて非定型 BSE プリオン感染牛を飼育した。定期的に臨床症状を観察し、BSE の症状などに

より飼育が困難と判断された時点で病理解剖した(表1)。

表1 脳内接種による非定型 BSE プリオン感染牛の解剖までの期間

No	品種	接種材料	接種→解剖 (日)	臨床 症状
4599	Hol	BSE/JP24	331	+
7653	Hol	BSE/JP24	382	+
3302	Hol	BSE/JP24	398	+
5956	Hol	BSE/JP24	400	+
0791	Hol	BSE/JP24	492	+

Hol: ホルスタイン種、BSE/JP24: 非定型 BSE

BSE プリオン感染牛の病理解剖は、動物衛生研究所高度衛生研究施設内において行った。鎮静および麻酔下において、当該牛を放血により安楽殺した。病理解剖時に各組織を採取した。

BSE プリオン感染牛から採取した各組織の乳剤を PK 処理し、リンタングステン酸 Na 溶液による沈殿法を用いた沈渣を検体とした。PrP^{Sc}の検出は、ウエスタンブロット (WB) 法により行い、HRP 標識 T2 抗体および化学発光試薬 SuperSignal West Dura (PIERCE) を使用し、化学発光検出装置 (Alpha Ease Fc) により検出した。

2) 黒毛和種における非定型 BSE の病態
黒毛和種 (n=3) を用い、試験 1) と同様に、非定型 BSE (BSE/JP24) 10%感染脳乳剤 1ml を脳内接種し、非定型 BSE プリオン感染牛を作出した。定期的に臨床症状を観察し、BSE の症状などにより飼育が困難と判断された次点で病理解剖した。臨床症状の観察において、接種した日から起算し、継続的な異常行動 (音への過剰反応、異常歩様など) が現れた日までの期間を潜伏期間とした。潜伏期間について、試験 1) の非定型 BSE プリオンを接種したホルスタイン種 5 頭およびこれまでに観察した定型 BSE プリオンを接種したホルスタイン種 9 頭と比較検討した。

(倫理面への配慮)

サンプル採取および分析、動物の剖検は、研究従事者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。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) 非定型 BSE におけるプリオン分布の解析

接種後 11 ヶ月より、時折音に過剰反応する、群から離れ孤立する、採血時に抵抗するなどの臨床上的変化が観察されたが、定型 BSE に比較し臨床症状は明瞭ではなかった。しかし、いずれの牛も接種後 11~16 ヶ月で歩様蹣跚または起立困難となり、定型 BSE よりも早期に飼育困難となった。

接種後 11 ヶ月で解剖した No.4599 (335dpi) では、網膜、視神経および顔面神経から PrP^{Sc} が検出された。接種後 12 ヶ月で解剖した No. 7653(382dpi)では、脊髄神経節、視神経、網膜から PrP^{Sc} が検出された。

接種後 13 ヶ月で解剖した No.3302(398dpi) および No.5956(400dpi)では、脊髄神経節、視神経など頭部の末梢神経の他、前頸神経節、星状神経節からも PrP^{Sc} が検出された。接種後 16 ヶ月で解剖した No.0791(492dpi)では、腕神経叢、肩甲上神経からも PrP^{Sc} が検出された。

いずれの牛においても、リンパ系組織、筋肉等からは PrP^{Sc} は検出されなかった。

2) 黒毛和種における非定型 BSE の病態解析

脳内接種による非定型 BSE プリオン感染牛の潜伏期間は、黒毛和種 418±56 日、ホルスタイン種 382±64 日であり、黒毛和種とホルスタイン種の間有意な差は見られなかった(表3)。これまでの研究課題で観察した定型 BSE (ホルスタイン種) の潜伏期間は 598±49 日であり、非定型 BSE プリオン接種した黒毛和種とホルスタイン種いずれも定型 BSE (ホルスタイン種) に比較し、短かった。

D. 考察

今回解析した5頭については、いずれも起立困難または歩様蹣跚の臨床症状を示し、脳および脊髄に PrP^{Sc}が蓄積していた。接種後11および12ヶ月では頭部の末梢神経に、接種後13ヶ月で体幹にある星状神経節、接種後16ヶ月では腕神経叢など前肢の末梢神経に PrP^{Sc}が検出され、経過に伴い、遠心性に PrP^{Sc}の分布が伝播することが示唆された。しかしながら、PrP^{Sc}はリンパ組織、筋肉などからは検出されなかったことから、非定型 BSE プリオン感染牛においても定型 BSE と同様に、PrP^{Sc}が神経系組織以外へ伝播する可能性が低いと考えられた。

黒毛和種における非定型 BSE の接種からの経過は、ホルスタイン種とほぼ同様であり、定型 BSE よりも早期に臨床的な異常行動が出現することが認められた。

E. 結論

脳内接種による非定型 BSE プリオン感染牛の末梢神経より PrP^{Sc}を検出した。非定型 BSE プリオン感染牛において、中枢神経で蓄積した PrP^{Sc}は、経過に伴い、中枢神経から遠心性に伝播すると考えられた。定型 BSE と同様に、PrP^{Sc}はリンパ組織、筋肉などからは PrP^{Sc}は検出されなかった。非定型 BSE の潜伏期間は、黒毛和種とホルスタイン種との品種間での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) Murayama Y, Yoshioka M, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Fukuda S, Onoe S, Yokoyama T, Mohri S. : Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). PLoS One, 2010 Oct 4;5(10).
- 2) Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Y-

okoyama T. : Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. Emerg Infect Dis, 2010 Jul;16(7):1151-4.

- 3) Fukuda S, Okada H, Arai S, Yokoyama T, Mohri S. : Neuropathological changes in auditory brainstem nuclei in cattle with experimentally-induced bovine spongiform encephalopathy. J Comp Pathol. 2011
doi:10.1016/j.jcpa.2010.12.013

2. 学会発表

- 1) 福田茂夫他: Intraspecies transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. 2010年プリオン研究会. 北海道札幌市. 2010年7月24-25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。

表2 非定型 BSE プリオン感染牛における中枢および末梢神経組織からの PrP^{Sc} 検出

牛 No.	非定型 BSE プリオン感染牛					定型 BSE プリオン感染牛					
	4599	7653	3302	5956	0791	3962	2601	886	4394	4437	5087
接種→解剖 (日)	331	382	398	400	492	345	470	541	610	700	716
解剖時の症状	起立 困難	歩様 踉蹌	歩様 踉蹌	歩様 踉蹌	起立 困難	なし	なし	なし	歩様 踉蹌	起立困 難	起立 困難
脳幹部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
下垂体	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
脊髓	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
脊髓神経節	-	+	+	+	+	ND	+	-	-	+	+
視神経	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
網膜	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	+
三叉神経節	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
顔面神経	+	-	-	-	+	ND	-	-	-	+	+
前頸神経節	-	-	+	+	+	ND	-	-	+	+	+
迷走神経	-	-	-	-	+	ND	-	-	+	+	+
星状神経節	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
交感神経幹	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
腕神経叢	-	-	-	-	+	ND	-	-	-	-	+
肩甲上神経	-	-	-	ND	+	-	-	-	+	+	+
副腎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表3 非定型 BSE における黒毛和種とホルスタイン種の潜伏期間の比較

接種	品種	供試頭数	潜伏期間 (日)	潜伏期間→解剖 (日)
非定型 BSE	黒毛和種	n=3	418±56 a	75±70 ab
	ホルスタイン種	n=5	382±64 a	19±24 a
定型 BSE	ホルスタイン種	n=9	598±49 b	95±40 b

a、b: 異なる文字間で有意差有り (p<0.01)