

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 基礎獣医学研究部門
小川 晴子 帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門
研究協力者 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 非定型 BSE (JP24) の伝達をマウス、ハタネズミ、モルモットで試みたが、伝達できなかつた。現在、スナネズミ、ハムスター、ラットに追加接種を実施し、経過観察中である。そのため、非定型 BSE と定型 BSE プリオンについて伝達動物を通じての比較病理学的性状解析には至らなかつた。昨年までの研究で、BSE 感染モデルおよび BSE 牛の小脳および脳幹部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が強く阻害されていることが確認され、BSE プリオンの性状の一端を明らかにした。本研究では、さらにグリア細胞、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 の発現が強くなり、また EAAT4 の腫大・変性が確認された。しかしながら、小脳、脳幹部と同様に強いプリオンの蓄積を示す大脳では EAAT1, EAAT4 に加え、小胞膜グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1, VGLUT2) や小胞膜 GABA トランスポーター (VGAT) の発現は非感染動物と同様であった。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。これらのことからプリオン感染脳では、グルタミン酸やドーパミン等のリサイクリングの異常、あるいは伝達異常が起きている可能性が示唆された。

A. 研究目的

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、前年度までにマウス、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、新たにスナネズミ、ラット、ハムスターに非定型 BSE の接種を行い、伝達モデル作製を計画した。

定型、非定型 BSE 伝達動物を用いて実施予定であった神経伝達物質のマーカーを用いた比較病理学的解析を、昨年度に引き続き BSE 伝達モルモットについて実施し、BSE プリオンの性状、BSE プリオン感染動物の病態を明らかにすることを目的とした。昨年度、BSE 伝達モルモット、BSE 感染牛では興奮性神経伝達物質グルタミン酸の小胞膜トランスポーターである VGLUT1 陽性シナプスの選択的な脱落があることを報告した。そこで、本研究では、この機序を明らかにすること、小脳・脳幹部以外の大脳での病態を明らかにすること、グルタミン酸、GABA に加えて、ドーパミン、

セロトニン等のいくつかのメジャーな神経伝達物質についても検討を加えることを目的とした。

B. 研究方法

1) 非定型 BSE の実験動物への伝達

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) をハムスター (Armenian, Cytogen (USA)、♀、5 週齢)、スナネズミ (MGS/Sea、九動、♀、6 週齢) およびラット (Wister、クレア、♀、4 週齢) に脳内接種を行い、経過観察を実施した (表 1)。

2) 神経伝達物質の免疫組織学的解析

研究室で維持されている BSE 伝達モルモット 3 代目 (脳内接種) を用いた。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(135DWH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。作製した病理切片に対して、グルタミン酸、GABA、ドーパミン、セロトニン、サブスタンスPのマーカースとして表2で示す抗体をそれぞれ用い免疫染色を行った。

(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) 非定型BSEの実験動物への伝達

昨年度報告したように、定型BSEが伝達できたマウスおよびモルモットでは、非定型BSE接種動物を自然寿命まで観察したが、免疫組織学的に陽性結果は得られなかった。ハタネズミについては接種動物の早期死亡が相次いだこともあり、非定型BSEの伝達は確認できなかった。現在、ハムスター、スナネズミ、ラットについて経過観察中である(表1)。

2) 神経伝達物質の免疫組織学的解析

昨年度報告したように対照非感染モルモット小脳分子層では、平行線維終末に発現する小胞膜グルタミン酸トランスポーターであるVGLUT1陽性シナプスは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、登上線維終末に発現する小胞膜グルタミン酸トランスポーターであるVGLUT2陽性シナプスおよび小胞膜GABAトランスポーターであるVGAT陽性シナプスでは比較的太い樹状突起に沿ってそれぞれ陽性が観察された。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、プリオン沈着小脳分子層部位ではVGLUT1陽性シナプスの顕著な減少がみられた。一方、大脳では皮質、海馬、および視床を中心にびまん性から斑状のプリオンの沈着が強い空胞変性を伴って観察された。これらプリオン沈着部位を含め大脳ではVGLUT1、VGLUT2およびVGATの陽性所見は対照動物と同様であり、小脳、脳幹部にみられたVGLUT1の選択的な減少は確認できなかった(図1)。

対照非感染モルモットでは、バグマングリア突起に発現する細胞膜グルタミン酸トランスポーターであるEAAT1に小脳分子層では点状から線状、プルキンエ細胞周囲性に陽性がみられた。また、プルキンエ細胞樹状突起シナプスに発現する細胞膜グルタミン酸トランスポーターであるEAAT4は樹状突起に沿って陽性を示した。一方、BSE伝達モルモットではプリオン沈着が観察され

た小脳分子層にバグマングリアの活性化に伴いEAAT1陽性部位の増加が顕著にみられた。また、EAAT4陽性を示す樹状突起シナプス部位は粗大顆粒状となっていた(図2)。また、大脳ではEAAT1、およびEAAT4がアストログリアに陽性を示していた。

ドーパミン作動性ニューロンに特異的に発現する細胞膜ドーパミントランスポーターDATによる免疫染色では対照動物に比較して、小脳分子層、プルキンエ細胞において発現の増加がみられた。また、大脳においても顕著な発現の増加がみられた(図3)。一方、セロトニン作動性ニューロンに発現する細胞膜セロトニントランスポーターHTTおよびサブスタンスPの発現は対照動物との差異はみられなかった。

D. 考察

BSE伝達モルモット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。小脳は形態的に同定可能なニューロンが特徴的な神経回路を形成し、シナプス伝達の特異的な分子の発現についても多くの知見がある。そのため、プリオンと神経変性のシンプルで明快な関係を明らかにする上で小脳に特徴的な病変を形成するBSE伝達モルモットは有用なモデル動物である。昨年度報告したように、BSE伝達モルモットおよびBSE牛についてグルタミン酸興奮性伝達物質のマーカースとして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は小脳顆粒細胞を起源とする平行線維終末に発現する小胞膜グルタミン酸トランスポーター)。

今回の研究ではプルキンエ細胞樹状突起シナプスに発現する細胞膜グルタミン酸トランスポーターEAAT4の粗大顆粒状の変性変化を示唆する所見が得られた。このことから、平行線維終末ではグルタミン酸の放出が行われず、シナプスを形成する樹状突起におけるグルタミン酸の再取り込みにも何らかの障害が起こっていることが明らかになった。小脳ではプリオンの蓄積による神経終末シナプス間のグルタミン酸のリサイクルの異常により小胞膜グルタミン酸の枯渇が生じた可能性が示唆された。一方、大脳ではVGLUT1陽性シナプスはプリオン沈着部位を含めびまん性に観察され、小脳や脳幹部にみられたような選択的な減少は確認できなかった。EAAT1およびEAAT4はアストログリアに陽性を示したことから、大脳ではプリオンの蓄積に関わらずアストログリアによるリサイクル機構が維持されているのかもしれない。一方、ドーパミンやセロ

トニンなどを放出するモノアミンニューロンは小胞膜トランスポーターも細胞膜トランスポーターもシナプス前側ニューロンに選択的に発現することが知られ、放出された伝達物質は神経終末に直接取り込まれ再利用されることが明らかとなっている。このことから本研究で明らかになった細胞膜ドーパミントランスポーターDATの過剰発現は、ドーパミンによるシナプス伝達の増強を示す所見と考えら、プリオン感染動物では過剰なドーパミンが放出されていることが明らかとなった。

E. 結論

プリオンの蓄積による平行線維-プルキンエ細胞シナプス活動の障害が、グルタミン酸のリサイクルの異常をもたらし、グルタミン酸の伝達を傷害している可能性が示唆された。また、プリオン感染脳では、過剰なドーパミンの伝達あるいはそれが生じやすい異常が起こっていることが明らかとなった。これらの知見はBSEプリオン性状の一端を示し、これら神経伝達物質の発現の異常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) Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T.: Predominant involvement of the cerebellum in guinea pigs infected with bovine spongiform encephalopathy(BSE). J Comp Pathol (in press).

2. 学会発表

- 1) Sakaguchi S, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T, Furuoka H.: Temporal Kinetics of Prion Protein Accumulation and Its Effect on Neurotransmitters in the Cerebellum of Guinea Pigs Infected with BSE Prion. Prion 2010, September 2010, Saltsburg, Austria.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

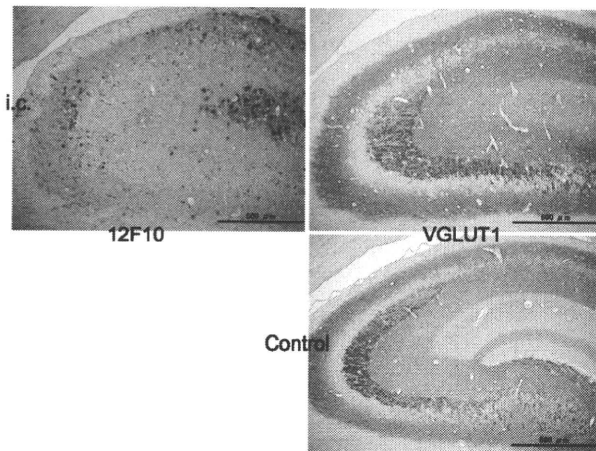
2. 実用新案登録

なし

表 1. 定型、非定型 BSE の実験動物への伝達結果 (網目部分については現在経過観察中)

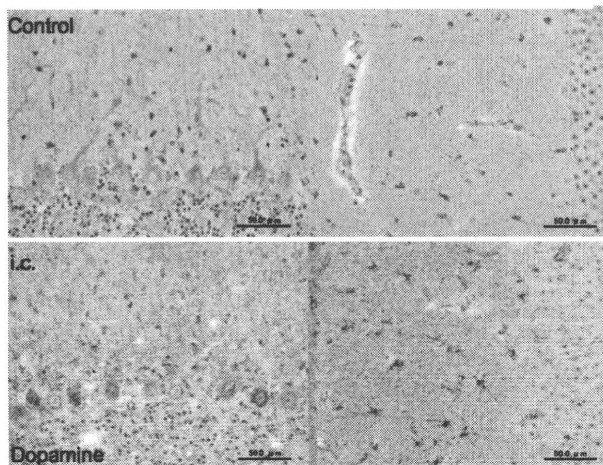
	No. of PrP ^{Sc} positive animals/No. of inoculated	incubation period(days)
Mouse	5/5	475.6 ± 99.6
Guinea pig	4/5	492.5 ± 229.4
BSE (JP10) Common vole	1/5	344
Hamster	5/5	409 ± 223
Gerbil	5/5	786 ± 36
Rat	0/5	> 741 ± 90
Mouse	0/5	>625
Guinea pig	0/5	>1291
非定型 BSE (JP24) Common vole	0/5	>198
Hamster	0/3	>274
Gerbil	0/5	>274
Rat	0/5	>274

図 1. 大脑海馬領域におけるプリオン、VGLUT1 の局在



感染モルモット (上) では海馬領域に顕著なプリオンの蓄積が観察される。しかしながら、VGLUT1 の発現は下の非感染対照モルモットと同様で、小脳にみられるような選択的な減少は観察されなかった。

図 3. 小脳および大脳におけるドーパミンの発現

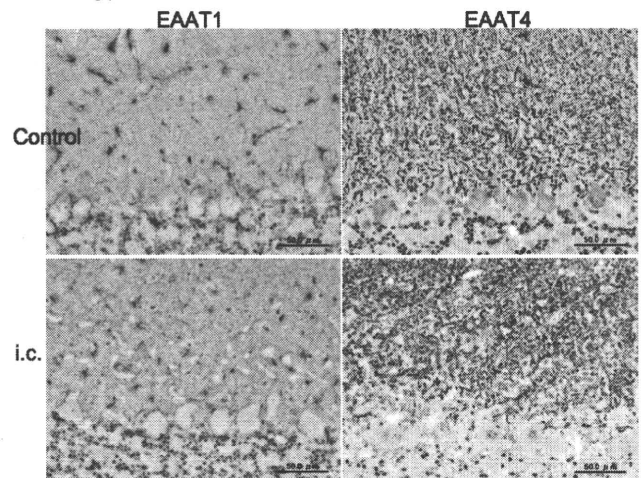


非感染対照モルモット (上) の小脳分子層 (左) および大脳皮質 (右) に比較して、感染モルモット (下) ではドーパミンの発現が強くみられる。

表 2. 使用抗体およびその局在

伝達物質	トランスポーター	主な発現部位
Glutamic acid	VGLUT1	平行線維終末
	VGLUT2	登上线維終末
	GLAST (EAAT1)	パーグマンガリア
	EAAT4	プルキンエ樹状突起
GABA	VGAT	
Dopamine	DAT	
Serotonin	HTT	
Substance P		

図 2. 小脳皮質における EAAT1 および EAAT4 の局在



非感染対照モルモット (上) ではパーグマンガリアの突起に一致して EAAT1、樹状突起シナプスに一致して EAAT4 陽性が見られる。感染モルモット (下) ではグリアの活性化に伴い EAAT1 の発現が強くみられる。また、EAAT4 は腫大し、変性性所見を示した。

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 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)

黒澤 明日香、飛梅 実、佐多 徹太郎 (国立感染症研究所・感染病理部)

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、C-BSE (BSE JP/8 和歌山)、L-BSE (非定型 BSE JP/24 佐世保) 発症ウシ脳乳剤および C-BSE 感染発症カニクイザルの脳乳剤、血液の接種を行い、発症サルについて脳 MRI 画像、プリオン蛋白及び病理組織について解析を行った。

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確立できた。L-BSE 初代接種カニクイザルでは潜伏期 19 ヶ月と C-BSE 初代接種に比べ短い潜伏期であった。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ヌスが先行し症状が進行していった。ウエスタ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} は薄く顆粒状に存在し、明らかなプ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。両株を用いたサルプリオン病発症モデル系により、vCJD および sCJD 病態解明への有用性が示唆された。さらに、早期診断系および治療研究に非常に有用なモデル系であると考えられた。

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。

カニクイザル 12 頭を用いて、BSE 感染牛 (BSE JP/8 和歌山 : C-BSE) 脳乳剤の脳内接種、経口投与、発症カニクイザル脳乳剤の脳内接種、輸血、および、非定型 BSE 感染牛 (BSE JP/24 佐世保 : L-BSE) 脳乳剤の脳内接種を行った。接種後、発症までに定期的臨床症状、行動機能、記憶能、脳波および安楽死直後の MRI 所見についての臨床病態解析を行いうるとともにタンパクおよび組織病理学的解析を行った。

B. 研究方法

1) 供試動物と接種方法

1.4~2.4 歳の育成雄カニクイザル 12 頭を用いた。使用動物は、P3 実験動物施設内の 2 頭飼育型アイソレーターにおいて順化飼育後感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27℃、相対湿度 50-60%、12 時間照明 (7 時~19 時) に設定し、ステンレス製個別ケージの間を透明アクリル板で仕切り、相互の体動、声を感じることでできる環境とした。飼料は固形飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.) 70g とリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

接種材料は BSEJP/8 和歌山発症ウシの 10% 脳乳剤、非定型 BSEJP/24 佐世保発症ウシの 10% 脳乳剤を用いた。また、C-BSE 接種後発症したカニクイザル(#007)の 10% 脳乳剤および血液を用いた。

経口投与は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、10% 脳乳剤 2ml を 1 週間間隔で 3 回投与した。

脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後イソジンで消毒し、頭皮膚切開、側頭部頭蓋骨に直径 2mm の穿孔部を作成し、視床に脳乳剤 0.2ml を注入した。注入後、皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

輸血は発症カニクイザル(#007)血液を ACD 液で採取し塩酸ケタミン麻酔下で点滴により 40ml を輸血した。レシピエントの輸血時体重はいずれも 1.7kg で全血量の約 30%に相当した。

2) 行動観察

接種前より定期的に神経症状発現について行動観察を実施し、ビデオ撮影を行った。

3) 材料採取

定期的に血液および脳脊髄液の採取を行った。動物は塩酸ケタミン麻酔下で血液は大腿静脈より採取し、脳脊髄液は背部剃毛後イソジンで消毒し、第 3～第 5 腰椎椎間より採取した。

体表リンパ節、腸管膜リンパ節および脾臓の生検を実施した。動物は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下で鼠経部および腹部の剃毛を行いイソジンで消毒し、皮膚切開後、鼠経リンパ節は、皮下組織を鈍性剥離後、基部血管を結紮し摘出した。腸管膜リンパ節および脾臓生検の場合は腹部正中を切開し、リンパ節の基部を結紮後摘出した。脾臓の部分生検は摘出部分の脾動静脈結紮後脾臓を切除し、切断面の縫合を行った。採取後腹膜、皮下組織および皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

4) ウェスタンブロッティング (WB)

細切組織を PBS 中で 2mmΦ 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 で消化した後に 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 mAb3F4 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。

5) MRI 撮像および画像解析

P3 動物実験区域内で管理されている動物は生存したまま管理区域外への搬出ができないため、MRI 撮像は安楽死直後に密封コンテナに封じ込めて MRI 室に搬送した。発症したカニクイザルは塩酸ケタミンにより鎮静後、ヘパリンを静脈内注

射し全身血液の凝固防止を行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により安楽死を行った。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 T1-3D、T2 およびプロトン強調画像、Flair 画像を撮像した。

画像解析にあたり、正常カニクイザルにおいて、生存麻酔下及び、BSE 感染サルと同様の条件での安楽死直後の画像について比較検討し、解析項目において、死亡による影響が少ないことを確認した。画像解析は、ボリューム解析プログラム VG studio max. を用いた。T1-3D 画像 (TR2500; TE3.87; FOV150mm; slice1mm; 192*96) について、大脳灰白質、白質および、脳室の体積を計測した。FLAIR sequences (TR9000; TE101; FOV180mm; slice2mm; 256*256) で撮像した海馬を含む冠状断において、脳内に分布している高信号域の信号強度と範囲の定量を実施した。

6) 病理組織検索

病理組織検索では、ホルマリン固定後、BSE 確認検査マニュアルに準じて、蟻酸処理後、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。免疫染色は 120°C オートクレーブ処理後、C-末ペプチド由来の抗プリオン抗体 (T4) による IHC 法を実施した。

空胞変性領域の計測は、HE 染色組織標本において、前頭葉および頭頂葉の白質及び灰白質の顕微鏡写真を撮影し、ボリューム解析プログラム VG studio max. を用いて計測した。

(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收容した。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、過剰量のペントバルビタールナトリウム静脈内投与に

より行った。

C. 研究結果

1) 発症経過

C-BSE 感染牛脳乳剤経口投与を行った3頭は投与7年を経過し、異常行動、神経症状は観察されていない。行動実験による高次脳機能検査においても、3頭とも優秀な記憶力を維持していた。1頭において、7年4ヶ月目に安楽死を実施した。

C-BSE 発症カニクイザル#007の血液を輸血した2頭は輸血後4年目までに、異常行動、神経症状は観察されていない。

C-BSE 脳内接種を行った3頭は、発症までの潜伏期間は29~44ヶ月、発症期間7~15ヶ月と個体差が認められたが、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。

C-BSE 発症カニクイザル#007の脳乳剤を脳内接種した2頭では、接種後13~15ヶ月で神経症状が認められ、発症4~6カ月後に安楽死を行った。初期症状は食欲不振、驚愕反応等行動異常とともに、軽度震戦や加速歩行等神経症状が認められた。症状の進行に伴い運動失調、四肢麻痺、四肢の固縮、ミオクローヌスが認められ、麻痺は進行し、起立困難となった。

L-BSE 感染牛脳乳剤を脳内接種した2頭では、接種後19ヶ月で神経症状が認められ約4カ月後に安楽死を行った。発症時期および発症期間は接種した2頭でほぼ同様の経過をたどった。症状は加速歩行、立毛、前傾で膝が内反した姿勢をとり、後肢指先の持続的な不随意運動、四肢の顕著なミオクローヌス、企画震戦、運動失調が認められ、麻痺は進行し、起立困難となった。明らかな驚愕反応は認められなかった。末期では無表情となり、観察者の接触に対する反応性が低下した。

(図1、図2、表1)

2) ウエスタンブロッティング(WB)法によるPrP^{Sc}の検出

生体より経時的に採材した、血液、リンパ節、脾臓等の材料から、WB法によりPrP^{Sc}は検出されなかった。

発症後安楽死を行った動物の、脳神経材料を用いて行ったWBでは、C-BSE(BSE JP/6)牛脳乳剤および、発症カニクイザル(#007)脳乳剤接種により経代したカニクイザル(#7,#10,#11,#16,#17)においては(BSE JP/6)感染牛脳と同様のパターンを示した。L-BSE(BSE JP/24)牛脳乳剤を接種したカニクイザル(#14,#15)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。(図3)

3) 脳MRI画像解析

図4にT2強調画像を示す。非感染サルの生前と安楽死後のMRI画像ではほぼ同様の所見であることから、BSE感染カニクイザルにおいても安楽死直後の画像は生前の所見を反映していると考えられた。

C-BSE 感染カニクイザルの脳乳剤を脳内接種した#16および#17において、脳室の顕著な拡張が認められた。特に症状の進行が早かった#17では側脳室、第3脳室とも顕著な拡張が認められると共に、脳溝周囲が高信号となっている。

L-BSE 感染牛の脳乳剤を脳内接種した#14、#15ではさらに顕著な脳室拡張と、灰白質の広範な高信号が認められた。また、海馬の萎縮が顕著であった。

3D(3次元)T1-MRIデータを用いて、大脳白質、灰白室、脳室体積について解析を行った。未感染同年齢カニクイザル雄について、イソフルレン麻酔下および、BSE感染サルと同様の安楽死を行った後の画像を正常コントロールとして比較を行った。未感染サルの生前、および安楽死後のデータでは、わずかに死亡後、白質体積が増加し、灰白室体積の減少が認められたが、MRI画像において境界閾値設定に生じる誤差の差か、死亡後の変性によるものかどうかは不明であった。脳室体積はわずかに生前の方が多かった。BSE感染サルにおいては正常サルの生前と死亡後の変動値を大幅に逸脱して、皮質、髄質とも顕著な体積の減少が認められた。C-BSE感染カニクイザル脳乳剤を脳内接種した#16,#17において、白質の萎縮が顕著であるのに対し、L-BSE牛脳乳剤を脳内接種した#14,#15では、白質、灰白室とも同程度の萎縮が認められた。脳室容積は#17,#14,#15で著しい増大が認められ特に#14で顕著であった(図5)。

図6はFLAIR画像(Fluid Attenuated Inversion Recovery(水抑制画像)である。T2強調画像では脳室等水の信号が高信号に描出されるため、水の信号を抑制したT2強調画像であるFLAIR画像を用いることで、脳室と隣接した部位の異常を明瞭に描出することが可能になる。vCJDにおいてPluvinerサインが認められる視床枕および、海馬を含む冠状断について各動物で高信号領域の信号強度と面積について比較を行った。

正常サルの生前と死亡後の画像を比較すると、死亡後の画像で、側頭葉下核付近がわずかに高信

号を呈していた。#16、#17においては、高信号領域およびその信号強度は未感染サルとの間に顕著な差は認められなかった。一方、#14、#15では側頭葉においてリボン状に顕著な高信号領域がひろがっているとともに、脳梁体が高信号に認められた。その信号強度 Maximau Valuem は正常サルと比較し、C-BSE で約 1.5 倍、L-BSE で約 2 倍と強信号が認められた。視床枕では明らかな異常信号は検出されなかった（表 2）。

4) 病理組織検索と空胞部画像解析

図 7 上段に C-BSE 感染カニクイザル脳乳剤を脳内接種した#16、#17、L-BSE ウシ脳乳剤を脳内接種した#14、#15 の HE 染色像を示す。いずれの動物も広範な空胞変性が認められ、大脳白質より灰白質に強く出ていた。図 7 中段は画像解析プログラムにより、空胞変性部を抽出し、抽出したエリアを青色で示したものである。組織写真全体の免責に占める抽出部分の面積の割合を図 8 に示す。空胞変性領域はいずれの動物も白質より灰白質のほうが高い割合を示した。前頭葉と側頭葉を比較すると、その割合は個体ごとで変動していた。空胞変性は#14、#15の方がより強く出ており、特に#14では灰白質の半分以上の割合を占める変性が認められた。

図 7 の下段には抗プリオン抗体による免疫組織像を示す。#16、#17では PrP^{Sc} の花弁状沈着が認められ、プラークの周辺には小空胞が集積していた。一方#14、#15では PrP^{Sc} は薄く顆粒状に存在し、明らかなプラークの形成は認められなかった。

D. 考察

カニクイザルへの C-BSE 継代接種（感染カニクイザル脳乳剤の脳内接種）では、初代接種の潜伏期が 27～44 ヶ月と個体差が大きく、長期間であったのに対し、13～15 ヶ月と 1/2～1/3 に短縮され、潜伏期、臨床経過とも再現性が高く、リスザルのスクレイピー感染実験、マウス、モルモットによる継代実験と同様に、種の壁を越えることによる馴化が成立した。L-BSE 初代接種カニクイザルでは潜伏期 19 ヶ月と C-BSE 初代接種に比べ短い潜伏期で、発症後の臨床経過も早く、サルに対する強い病原性が認められた。臨床症状は C-BSE 接種群では驚愕反応等、突発的な行動異常が先行して観察された後、神経症状が発現し、人 vCJD に似た臨床経過を示した。L-BSE 接種群ではミオクローヌスが先行し、固縮、起立不能、認知障害と思われる症状が徐々に進行した。初代 C-BSE 接種群においては、行動実験による高次脳機能検査、皮質脳波測定を実施し、症状末期での記憶力障害

が認められ、脳波では PSD を伴わない低振幅化が認められた。C-BSE 継代接種群、L-BSE 接種群においては検査を実施しなかったが、今後継代接種実験を行う際、病態発現機序を解明し、早期診断モデル系を確立する上で有用な情報となると考えられる。

ウエスタ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ことから、種の壁を越えて接種、継代を行っても接種源の glycoform profile を維持することがわかった。

安楽死直後の MRI 画像では著しい脳室拡大が認められ、正常個体に比べて C-BSE 継代接種サルで白質の萎縮が進行していた。また、FLAIR 画像において、高信号領域の拡大が認められた。人症例においても、皮質で同様のリボン状の高信号所見についての報告がある。一方、人では視床枕における、異常信号が診断基準とされているが、サルでは明らかな異常は認められなかった。P3 感染実験では生体の施設外への搬出は認められない。本研究において、呼吸型密封コンテナを開発し、P2 感染実験レベルの動物の移動を可能とした。今後システムの安全性をさらに高め、経時的な MRI 撮像を行うことにより、早期診断方法を確立できると考えられる。

病理学的所見においては C-BSE 接種群で PrP^{Sc} では PrP^{Sc} は薄く顆粒状に存在し、明らかなプラークの形成は認められなかった。プラークの周辺には小空胞が集積していた。明らかなシナプティックパターンを孤発性 CJD (sCJD) に類似したシナプティックパターンが認められた。PrP^{Sc} の沈着様式は異なっていたが、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。MRI 所見と比較すると、脳質拡大に認められる萎縮レベルと空胞領域の計測とほぼ相関が認められたが、MRI による脳萎縮所見で C-BSE 接種群の白質の萎縮が進行している所見が認められたが、病理所見では、空胞変性領域は灰白質の方が増大しており、空胞変性と脳萎縮が必ずしも直結していないことから、今後さらに臨床症状、神経脱落と画像診断の対応について検索を進める必要がある。

E. 結論

C-BSE 感染カニクイザル脳乳剤の脳内接種による継代により、潜伏期間は半減し再現性の高い早期発症モデル系が確立した。L-BSE 感染ウシ脳乳剤の脳内接種カニクイザルでは C-BSE 初代接

種に比べ短い潜伏期で発症し、霊長類に対し病原性が高いことが明らかになった。これまで、L-BSE によるヒト vCJD の報告はないが、今後さらに病原性、発症機序の解明が重要と考えられた。臨床症状、蛋白解析、MRI 所見、病理組織学的所見において、C-BSE 接種群と L-BSE 接種群で異なる所見が認められたことから、両株を用いたサル CJD 感染モデル系により、vCJD および sCJD 病態解明への有用性が示唆された。さらに、早期診断系および治療研究に非常に有用なモデル系であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono F, Tase N, Kurosawa A, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Terao K, Sata T.: Atypical L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy (L-BSE) Transmission to Cynomolgus Macaques, a Non-Human Primate. Jpn J Infect Dis. 2011 Jan;64(1):81-4.
- 2) Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Kurosawa A, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K.: Experimental Transmission of

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) to Cynomolgus Macaques, a Non-Human Primate. Yamakawa Y, Sata T. Jpn J Infect Dis. 2011 Jan;64(1):50-4.

2. 学会発表

- 1) Fumiko Ono, Yoshio Yamakawa, Minoru Tobiume, Yuko Sato, Harutaka Katano, Kenichi Hagiwara, Iori Itagaki, Akio Hiyaoka, Katuhiko Komatuzaki, Yasunori Emoto, Hiroaki Shibata, Yuichi Murayama, Keiji Terao, Yasuhiro Yasutomi and Tetsutaro Sata.: Transmission of classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to cynomolgus macaques. PRION 2010 - Salzburg, September 8 - 11, 2010

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

図1 潜伏期と発症経過

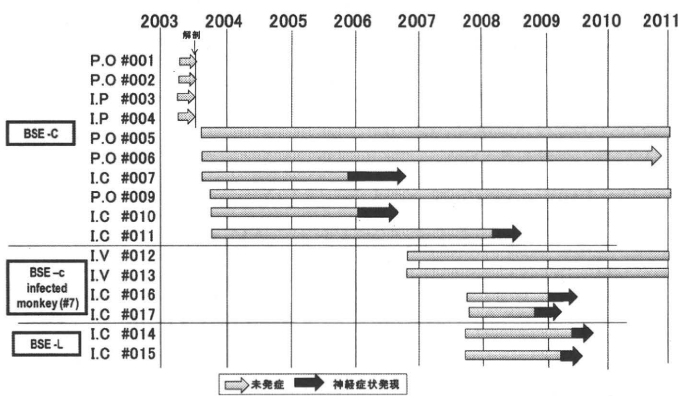


図2 発症サルの神経症状



て餌を食べることができないため、流動食投与

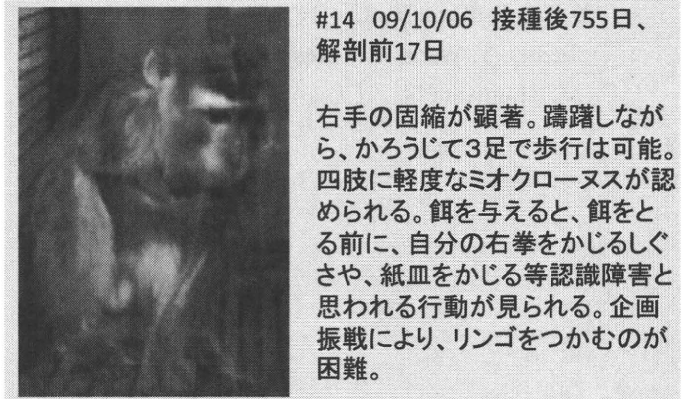
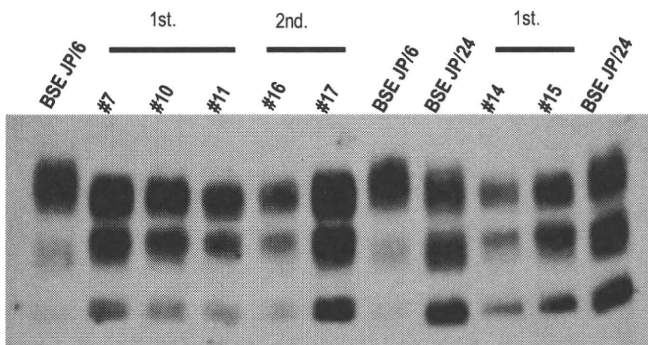


表1 神経症状

BSE agent	C-BSE						atypical (L-BSE)	
	primary			2ndary			primary	
transmission	#7	#10	#11	#16	#17	#14	#15	
Incubation period (months)	29	27	44	15	13	19	19	
Euthansia period (months)	37	35	59	20	19	25	24	
abnormal behavior signs								
depression	-	+++	-	+	-	-	-	
self injurious behavior	+	-	+	-	-	-	-	
anorexia	+	-	+	-	+	-	+	
scordinema	-	+	-	-	-	-	-	
hyperplexia	+++	+++	++	++	++	-	-	
Neuronal disorders								
(cerebellar) ataxia	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	
trmor	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	
myoclonus	++	++	++	-	++	+++	+++	
paralysis	+++	++	+++	+	++	+++	+++	
astasia	+++	++	+++	-	+	+++	+++	

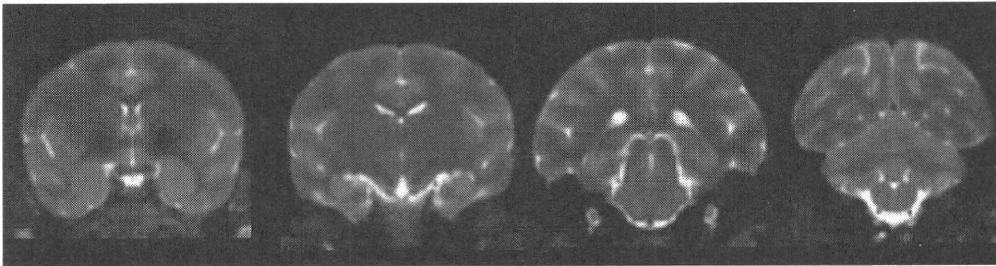
図3 発症カニクイザル神経組織におけるPrPSC の分布(WB法)



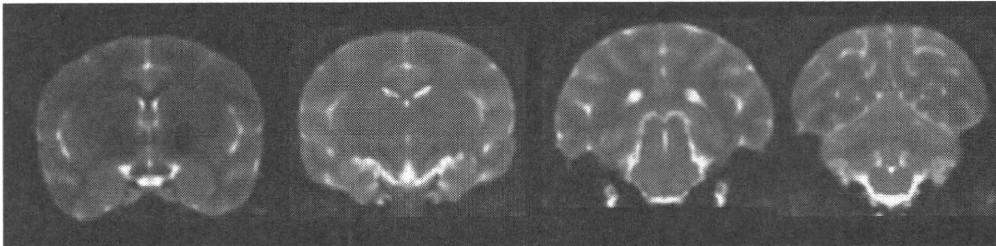
C-BSE(BSE JP/6) 牛脳乳剤および、発症カニクイザル脳乳剤接種により経代したカニクイザル(#7,#10,#11, #16, #17)においては(BSE JP/6) 感染牛脳と同様のパターンを示した。L-BSE (BSE JP/24) 牛脳乳剤を接種したカニクイザル(#14, #15)の glycoform profile はC-BSE接種群と異なり、L-BSE感染牛脳と同様のパターンであった。

図4 MRI 所見 (T2 強調画像)

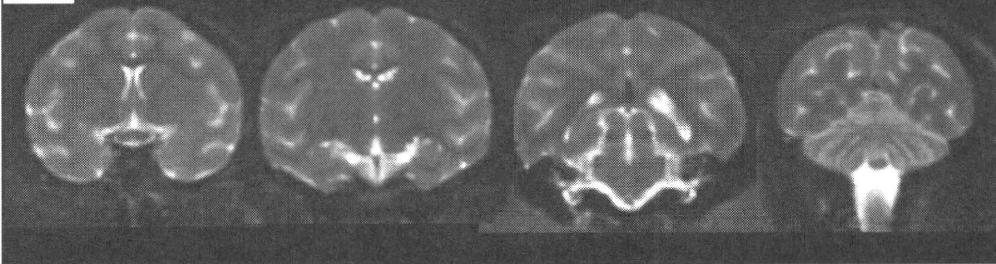
非感染サル(イソフルレン吸入麻醉下)



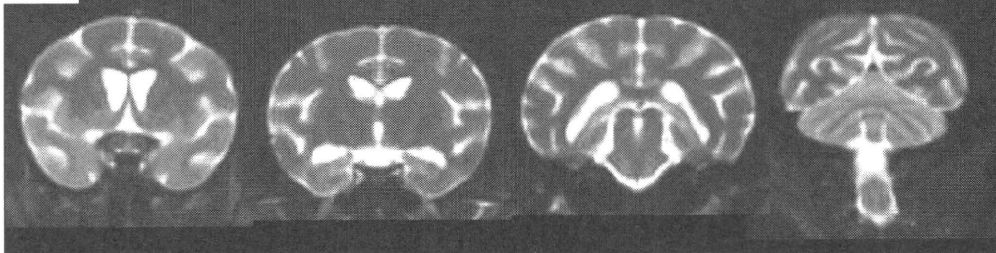
非感染サル(安楽死後)



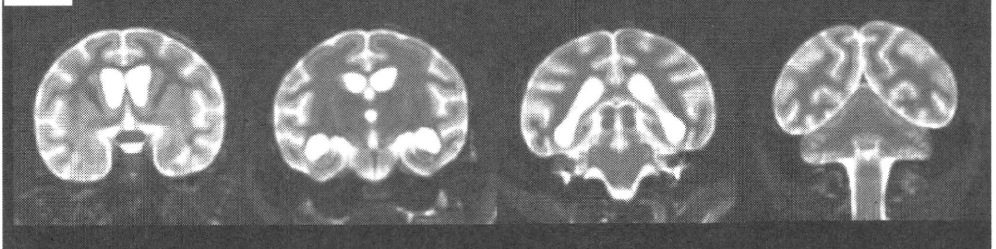
#16



#17



#14



#15

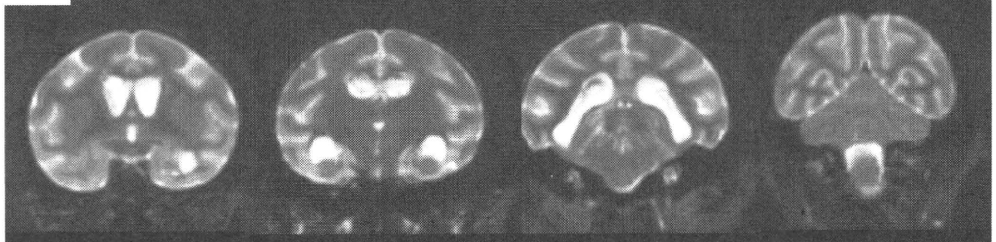
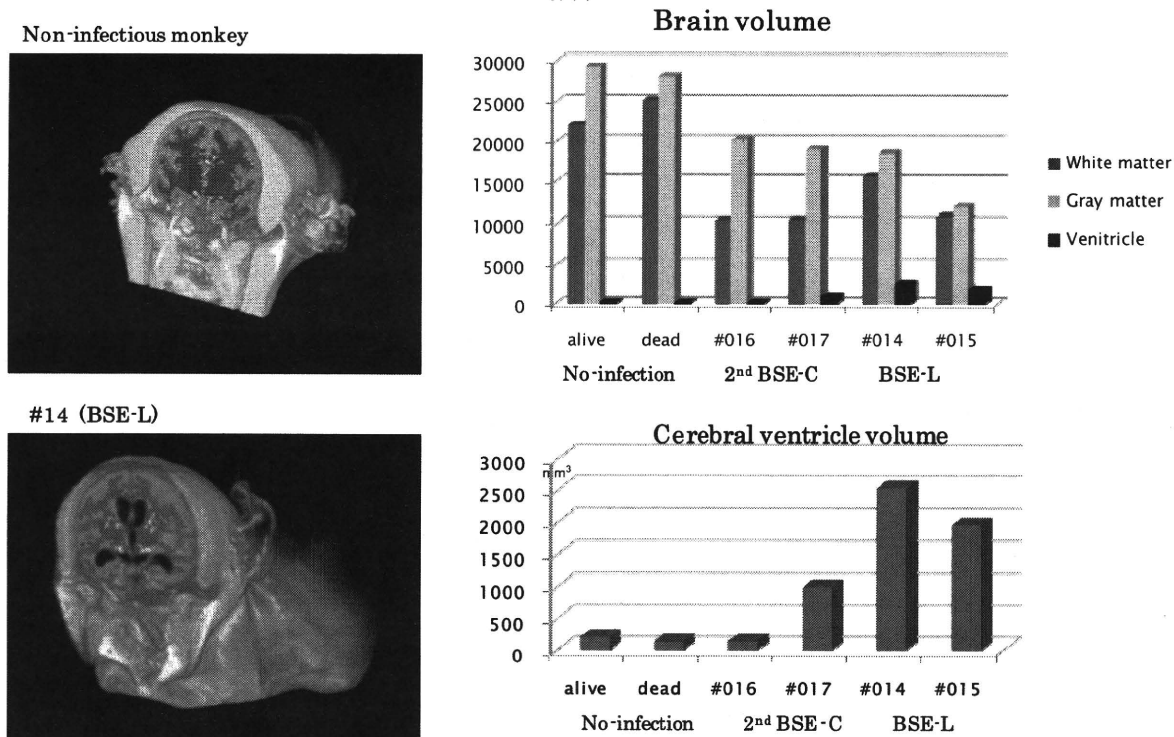


図5 MRI画像解析によるBSE感染カニクイザルの脳容量解析



T1-3D画像(TR2500; TE3.87; FOV150mm; slice1mm; 192*96)において、ボリウム解析プログラムVG studio max.を用い大脳白質、大脳灰白質 および、脳室体積の計測をおこなった。

図6 MRI FLAIR 画像解析による高信号域の定量

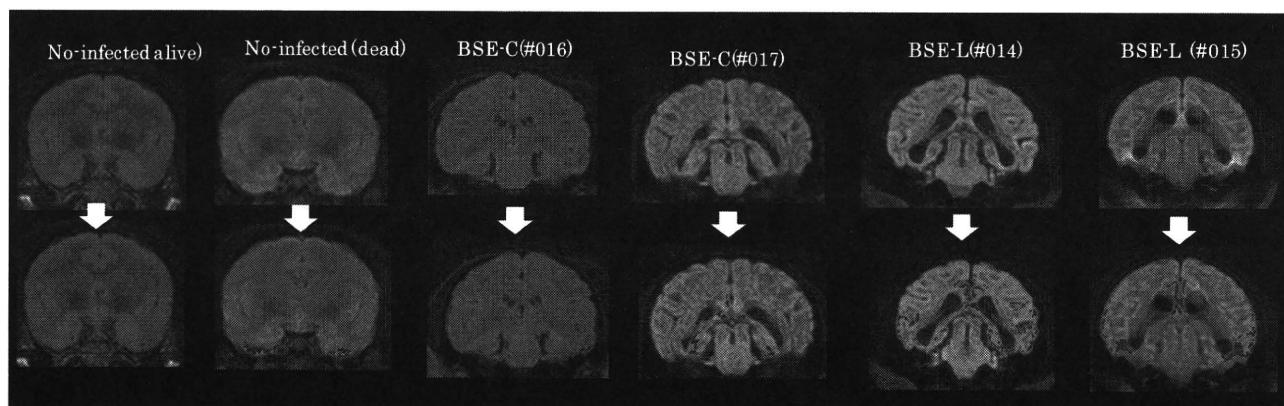
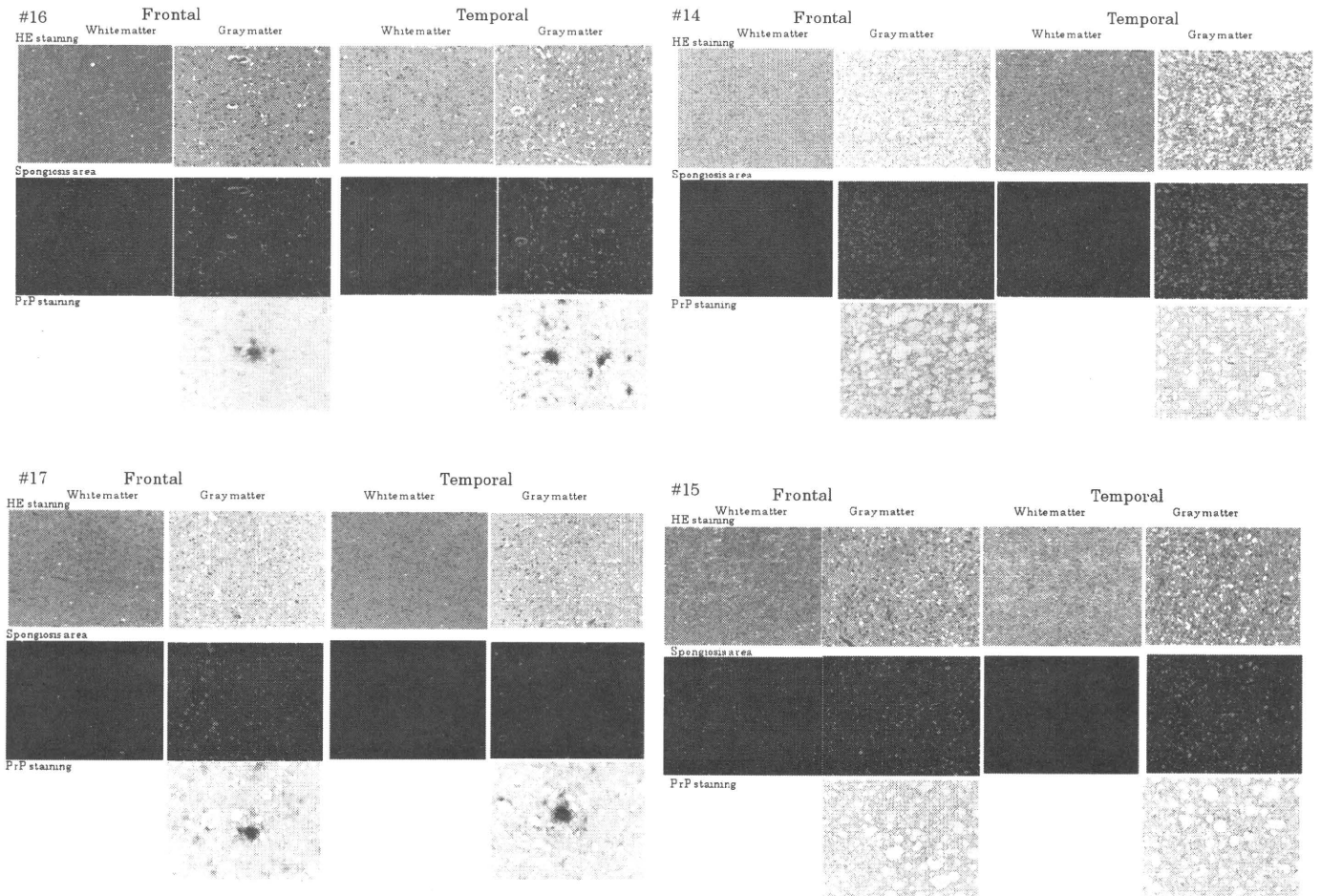


表2 MRI FLAIR 画像解析による高信号域の定量

High intensity area	Normal alive		C-BSE		L-BSE	
	Alive	Dead	#016	#017	#014	#015
Minimum value	359	341	476	480	524	474
Maximum value	446	391	590	615	654	818
Mean value	365	361	517	553	554	508
Volume (mm ³)	13	32	17	51	4133	6405

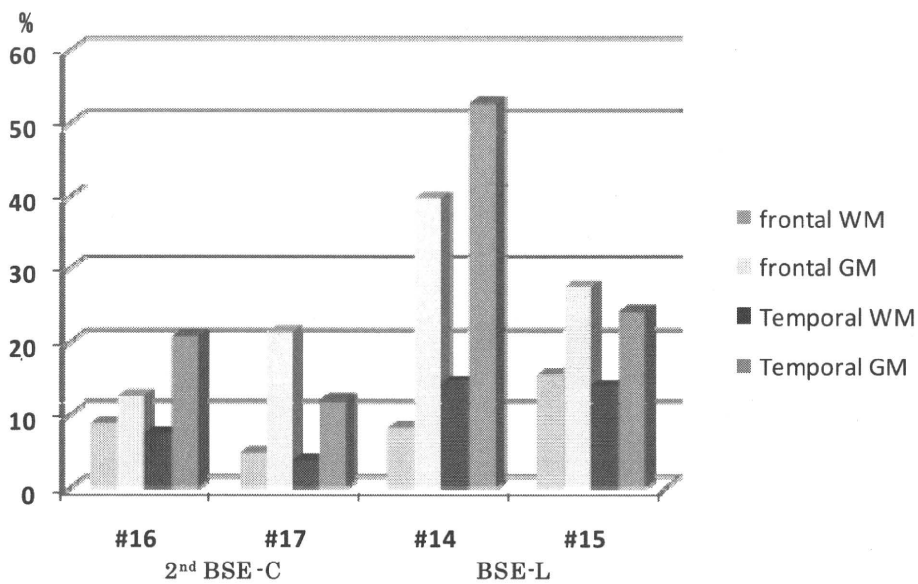
FLAIR sequences (TR9000; TE101; FOV180mm; slice2mm; 256*256)において、脳内に分布している高信号域の信号強度と範囲の定量を実施した。海馬を含む冠状断を用いて解析を選択した高信号領域が赤色反転部分である。選択部分の信号強度と面積を計測した。

図7 発症カニクイザル前頭葉および頭頂葉の病理組織所見



上段: HE染色、中段: ボリューム解析プログラムVG studio max.を用い空胞部分抽出 下段: C-末ペプチド由来の抗プリオン抗体による免疫染色

図8 HE染色組織像における空胞変性領域の定量解析



頭頂葉及び、側頭葉HE染色顕微鏡画像より、大脳白質および灰白質に認められる空胞部の面積を抽出し、領域全体に占める比率を計測した。

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

分担研究者 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、大内史子、原 英之、中村優子 (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 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)。しかし、JP24 と類似の性状と考えられるイタリアの非定型 BSE 罹患ウシ (BASE) では 2 代目伝播実験により classical BSE 様の PrP^{Sc} の蓄積が検出されたと報告されていることから、本研究においても、初代伝播の見かけ上の結果は陰性である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。SJL は、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においても PrP^{Sc} 陰性であり、病理組織観察での脳の空胞変性も認められなかった (現在、RIII の生化学/免疫組織化学データを分析中)。また、現在も継続観察中の C57BL/6 にも発症の兆候は認められない (2011 年 1 月 31 日現在、接種後 712 日目)。一方、classical BSE (JP6 と JP12) 由来の BSE プリオンは上記の近交系マウスへ伝播可能であり、3 代目伝播を経てマウスへの馴化を進めることができた。以上のように JP24 由来の非定型 BSE プリオンの病原性は、1) classical BSE プリオンとは明確に異なっていること、また、2) 類似性が指摘されている BASE プリオンとの比較においても相互に微妙な相違があることが示された。

A. 研究目的・背景

JP24 (Sasebo)例は、脳神経系に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、classical 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]。

そこで本研究では、1) 非定型例である JP24 のプリオン病原体は、果たして近交系マウスへ伝播可能かという点、および 2) JP24 プリオンが近交系マウスへ伝播可能ならば、マウスへ伝播後の異常型プリオン蛋白質は、「非定型」の特徴を維持するのか、それとも classical BSE の特徴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、この非定型例の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。また、近交系マウスに対して伝播し得るならば、継代により病原体の株化を進めることとした。

B. 研究方法

C57BL/6J (♀) と SJL (♀) は日本チャールズ・リバーより購入し、RIII (♂・♀混合; 繁殖効率が低く、必要匹数を確保するために♂・♀混合となった)は米国 Jackson Laboratory より購入した。接種したマウス脳乳剤の調製法は一昨年 of 報告書に記載したとおりであり、以下の匹数の 6~8 週齢のマウスに対して脳内接種を行った。2 代目伝播: <JP24>; BL to BL6=20, SJL to SJL=20, RIII to RIII=4 <JP6>; BL to BL6=7, SJL to SJL=10, SJL to BL6=6, RIII to RIII=4 <JP12>; BL to BL6=7, SJL to SJL=21, SJL to BL6=14,

RIII to RIII=4. 3代目伝播：<JP6> ; BL to BL6=7 <JP12> ; BL to BL6=7.

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、-80°Cにて保管あるいはホルマリン固定を施した。また、プリオン病様の症状とは断定できないが、長期飼育中に何らかの衰弱症状を呈したマウスは安楽殺に処し、同様に採材した。採材した組織は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（T4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罹患ウシの脳組織ないしスクレーパーObihiro I株を感染させたマウスの終末期の脳のホモジネートを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、各採材試料中に検出されたPrP^{Sc}量はコントロールのシグナル強度で標準化することにより定量的に比較した。

また、本研究の近交系マウスを用いた伝播実験が進行するにつれて、JP24由来プリオンが近交系マウスへ伝播しない可能性が高まってきた。そこで、マウスPrPのアミノ酸配列上でどの残基がJP24由来プリオンへの感受性・伝播に重要であるかを探索するために培養細胞を用いた*in vitro*実験系の開発を試みた。

（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病身体等安全管理規定を遵守した。組換えDNA実験は国立感染症研究所の組換えDNA実験安全委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) JP24ウシ脳ホモジネートのC57BL/6J、SJL、RIIIマウスへの初代伝播実験では、マウスの脳・脾臓・回腸遠位部はPrP^{Sc}陰性であり、脳神経組織の病変像も認められなかった。しかし検出限界以下の病原体が増殖・存在している可能性が考えられたため、見かけ上はPrP^{Sc}陰性のマウス脳ホモジネートについて、同系統のマウスへ2代目の

脳内接種を行った。その結果、SJLマウスは自然寿命（接種後591日目まで観察；細網肉腫により死亡するマウスが多い）中にプリオン病症状を示した個体は無く、採材した脳、脾臓、回腸遠位部にPrP^{Sc}の蓄積を認めた個体も無かった。RIIIマウスも自然寿命中（接種後827日目まで観察）に発症症状を示した個体は無く、現在、生化学分析／免疫組織化学を進めている（分析結果が得られるまで断言できないが、陰性である可能性が高いと予想される）。また、C57BL/6Jは、現在、経過を引き続き観察中であるが、外見的な発症の兆候は認められていない（接種後712日目）。

2) 非定型BSEの感受性・増殖に関与するPrPのアミノ酸残基を培養細胞を用いて探索するための実験系の開発を試みた。プラスミドを用いてマウス／ウシPrPを細胞に発現させる場合に、発現プラスミド（=SV40複製開始点をもつ）のepisomalな複製ができる系が望ましいと考えた。この目的にはSV40 largeT抗原（T-Ag）の遺伝子導入により不死化させたHpl3-4細胞やGT1細胞が適するが、Hpl3-4やGT1細胞に対してリポフェクションの常法に従ってマウス／ウシPrPの発現プラスミドを用いてPrPの強制発現を行って見たところ、PrPの発現レベルが何故か低い。プラスミドのトランスフェクション条件を検討しつつ、現在、CMV、EF1 α 、またはユビキチンプロモータの下流にT-Ag cDNAを配することでT-Agを発現する新たな細胞の作出を試みている。

D. 考察

JP24由来のBSEプリオンの糖鎖型は、イタリアで先行して摘発された非定型BSE（BASE）[Casalone C, et al, Proc Natl Acad Sci USA 101: 3065, 2004] 病原体の糖鎖型（無糖鎖：1糖鎖：2糖鎖が占める比率）と極めて類似している。本研究の計画作案時には「BASEプリオンの伝播実験結果」は未発表であり、そのため「JP24プリオンは近交系マウスへ伝播可能」と想定し、近交系マウスへの伝播実験によりプリオンの株化を行うことを考えていた。しかし、本研究の遂行途中で「BASEプリオンをC57BL/6およびSJLマウスへ接種すると、初代ではPrP^{Sc}蓄積が検出されな

いが、2代目継代を行うと classical BSE プリオンと識別不能な糖鎖型および病理学的特徴を生じた」という報告がなされた [Capobianco R, *et al*, *PlosPathog* 3: e31, 2007]。興味深いことに、このイタリア BASE 例の伝播実験の報告と異なり、本研究の JP24 由来のプリオンの近交系マウスへの接種では初代伝播、2代目伝播ともに PrP^{Sc} の蓄積はこれまでに検出されていない。両者の違いの原因として、BSE/JP24 プリオンと BASE プリオンとは類似した生化学的性状を有しながらも病原性には相違があるためか、あるいは BASE 罹患ウシ (= 野外摘発例) は非定型プリオンと classical BSE プリオンに 2 重感染していたという可能性が考えられる。

本研究班では、霊長類 (カニクイサル) への脳内接種により JP24 由来の非定型 BSE プリオンの霊長類モデルへの伝播に成功している。「JP24 由来プリオンは近交系マウスへの伝播は起こらない」という本研究の実験結果を進展させるならば、ひとたび霊長類へ伝播させた後の JP24 由来の非定型 BSE プリオンは近交系マウスへ伝播可能であろうか (霊長類を宿主として介することで非定型 JP24 プリオンの病原性等に変化・修飾が起こるだろうか?) といった新たな疑問が湧き、今後の課題として興味深いと思われる。

E. 結論

近交系マウス 3 系統への初代伝播実験において、JP24 病原体は PrP^{Sc} の蓄積や神経組織の変性を起こさなかった。引き続き行った 2 代目接種マウス群においても、PrP^{Sc} の蓄積や発症症状はこれまでのところ認められていない。さらに、現在、観察継続中の C57BL/6J マウスについても自然寿命が近づきつつあるが、発症兆候は認められず、PrP^{Sc} の蓄積は陰性である可能性が高い。一方、本研究で並行して伝播実験を行った classical BSE 2 例 (BSE/JP6 と JP12) のプリオンについては、本年度までの 3 代目伝播の繰り返しを経てマウスへの馴化が進んだ。先に非定型 BSE/JP24 病原体と classical BSE 病原体とは、ウエスタンブロット分析での糖鎖型、患畜ウシの脳組織での PrP^{Sc} の免疫組織化学像が異なっていることが認められ

ていたが、以上のように本研究により両者は病原性の上でも明らかに異なっていることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka M, Hara H, Nishina H, Hanada K, Hagiwara K, Maehama T: An improved method for cell-to-cell transmission of infectious prion. *Biochem Biophys Res Commun*, 397: 505-508, 2010.
- 2) Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T: Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. *Emerg Infect Dis*, 16: 1151-1154, 2010.
- 3) Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Nishijima M, Hanada K, Hagiwara K: Identification and structural analysis of C-terminally truncated collapsin response mediator protein-2 in a murine model of prion diseases. *Proteome Sci*, 8: 53, 2010 (doi:10.1186/1477-5956-8-53).
- 4) Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Kurosawa A, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T: Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to *Cynomolgus* macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis*, 64: 50-54, 2011.
- 5) Ono F, Tase N, Kurosawa A, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Terao K, Sata T: Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to *Cynomolgus* macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis*, 64: 81-84, 2011.

2. 学会発表

- 1) Hara H, Okemoto-Nakamura Y, Shinkai-Ouchi, F, Yamakawa Y, Hagiwara K: Novel PrP epitope modulating conformational change from PrP^C to PrP^{Sc}. Prion 2010, 2010年9月、Salzburg.
- 2) 原 英之, 中村 優子, 大内 史子, 山河 芳夫, 萩原 健一: PrP^C→PrP^{Sc}構造変換を調節する新規プリオンタンパク質ドメインの解析. 第33回日本分子生物学会年会／第83回日本生化学会年会 合同年会 2010年12月、神戸.

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

なし

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

研究分担者 石黒 直隆 岐阜大学応用生物科学部 獣医学課程 教授
研究協力者 貞池哲志、玉生英久（岐阜大学応用生物科学部 食品・環境衛生学教室）

研究要旨 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検査で確認された。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、また、細胞間の伝播にはレシピエント細胞の増殖に加えてドナー細胞の活性化がプリオンの伝播を促進することが示唆された。さらに、細胞間伝播には細胞間の直接接触が重要であり、培養液を介した伝播は低率であることが明らかとなった。

A. 研究目的

牛海綿状脳症(BSE)やスクレイピーの病原体であるプリオンは、経口的に取り込まれた後、腸管のリンパ組織であるパイエル板から生体内に侵入すると考えられている。しかし、生体に侵入してから脳などの中枢神経系に蓄積するまでには、かなりの年月が必要であり、どのような経路で腸管のリンパ系組織から中枢神経系へ移行するかは明らかではない。その一方で、腸管の免疫系組織において、プリオンの分解や排泄がなされていることが予想される。本課題では、腸管における免疫系組織でのプリオンの動態や取り込み、分解について解析をおこなってきた。動物種によって、腸管でのリンパ系組織の発達が大きく異なることから、腸管でのリンパ系組織の発達とプリオン感染との関係については十分な研究がなされていない。我々は、これまでの研究で、腸管でのリンパ系組織の発達やリンパ系細胞でのプリオンの分解性や蓄積性について解析した。

今年度は、牛の腸管でのリンパ系組織の発達具合を牛の CD 抗原やサイトカインレセプターの発現において検討し、プリオンの取り込みに影響を与えらると思われるリンパ系組織の成熟度を初生牛と 2 ヶ月齢の牛に関して解析した。また、免疫系細胞から神経系細胞へのプリオンの伝播性や蓄積性を培養細胞を用いて解析した。その結果、PrP^{Sc}の細胞間の伝播には、細胞同士の直接接触が必要であり、免疫系から神経系への伝播は、低率であることが明らかとなった。

B. 研究方法

1) ウシ腸管の採取検体と免疫組織化学検査

初生牛と 2 ヶ月齢牛の回腸を 5 ミリ角程度に細切し、OCT に封入後液体窒素にて急速冷凍し、試料切片を作成するまで、-85℃の冷凍庫に保管した。免疫組織化学検査に用いた切片は、凍結した腸管試料からクリオスタットにて 5 μ の切片を作成して用いた。

免疫組織化学的検査に用いた抗体は、以下のものである。抗 CD4, 抗 CD8, 抗 TCR, 抗 WC3, 抗 WC1, 抗 WC6, 抗 T19, 抗 CD25 のモノクローナル抗体である、また、IL-4R, IL-6R, IL-10R, IL-13R 抗体は、膜上に発現する抗原決定基をコンピューター上で予測し、合成ペプチドを合成して、BALB/c マウスに免疫して作成した。免疫組織化学検査は、常法に従って実施し、細胞はヘマトキシリンにて核染色した。

2) 混合培養による PrP^{Sc} の伝達試験

腸管での免疫系細胞から神経系細胞への伝播を想定して、ドナー細胞やレシピエント細胞の組み合わせをいろいろと変えて実験を行った。なお、ドナー細胞(1~8 X 10⁵)とレシピエント細胞(4 X 10⁵)との混合培養は、レシピエント細胞が 6cm シャーレで細胞がコンフレントになったところで細胞を回収し、新しい 6cm シャーレに継代培養した。通常、レシピエント細胞の培養は 4 日おきに 5 分の 1 ずつ継代することにより行い、PrP^{Sc}の蓄積性や分解性をウエスタンブロットで確認した。

(1) PrP^{Sc}感染細胞の樹立：マウスチャンドラー

株に感染しているマウス脳乳剤 10 μ l を N2a-3 細胞に添加して PrP^{Sc} 陽性 N2a-3 株を樹立した。この樹立細胞は、神経間伝播での PrP^{Sc} のドナー細胞として用いた。

(2) 脾臓細胞から神経細胞への伝播：チャンドラー感染マウスの脾臓より脾臓細胞を分離し、レシピエントの N2a-3/EGFP と一日混合培養して、脾臓細胞から N2a-3 株への PrP^{Sc} の伝播を検査した。培養液としては 10%FCS 加 DMEM を用いた。

(3) 脾臓細胞を活性化後、神経細胞への伝播：チャンドラー感染マウスの脾臓から脾臓細胞を分離し、コンデシヨナル培地にて 2 日間培養後、レシピエント細胞である N2a-3/EGFP 細胞と混合培養して、PrP^{Sc} の伝播を試験した。

(4) マウスマクロファージ (M ϕ) Raw 細胞から神経細胞への伝播：マウス M ϕ の Raw 細胞にチャンドラー感染 10%脳乳剤 20 μ l を添加し、6 時間 Raw 細胞に PrP^{Sc} を取りこかせた後、レシピエント細胞 N2a-3/EGFP と混合培養して、M ϕ Raw 細胞から神経細胞への伝播を検査した。

(5) 感染神経細胞から神経細胞への PrP^{Sc} の伝播：ドナー細胞 (PrP^{Sc} 感染 N2a-3 細胞) とレシピエント細胞 (N2a-3/EGFP) とを混合培養して神経細胞間での PrP^{Sc} の伝播を検査した。

(6) 培養液を介した伝播試験：PrP^{Sc} の伝播が細胞間の直接接触なのか、それとも培養液を介した伝播なのかを明らかにする目的で、人工フィルター・インサートを用いて、ドナー細胞とレシピエント細胞が直接接触しないように隔離し 3 日間培養した。ドナー細胞からレシピエント細胞への伝播は、レシピエント細胞を継代培養して PrP^{Sc} の蓄積性で判断した。

3) 間接蛍光抗体法による脾臓細胞内での PrP^{Sc} の局在解析

マウスチャンドラー株感染末期のマウスより脾臓を採取し、コンデシヨナル培地を用いてスライドチャンバーにて培養した。2 日間培養後、脾臓細胞での PrP^{Sc} の局在を間接蛍光抗体法を用いて解析した。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。

混合培養における PrP^{Sc} を有するドナー側の識別は、蛍光顕微鏡下での GFP 陰性、PrP^{Sc} 陽性を指標にし、レシピエント側の識別として、GFP 陽性、PrP^{Sc} 陰性を用いた。また、混合培養によりドナー側からレシピエント側への PrP^{Sc} の伝播の確認は、GFP 陽性および PrP^{Sc} 陽性を指標とした。

4) 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 である。培養細胞は 6cm シャーレで培養し、細胞がコンフレントになった状態で回収して WB 試料とした。培養細胞内の PrP^{Sc} の取り込みと蓄積量は、プロテナーゼ K(PK)処理後 WB で解析した。

(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を得て行った。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、初生牛と 2 ヶ月齢のウシを用いた実験も岐阜大学応用生物科学部の実験動物委員会の許可を得て実施した。

C. 研究結果

1) 牛回腸での免疫系細胞の分化

BSE 感染牛の疫学的調査によると、若齢牛が最も感染率が高いことが示されている。それは、プリオンに暴露する機会が多いと同時に、若齢牛での回腸は、外部の抗原を旺盛に取りこみ自己の免疫系を発達させるからである。本研究では、初生牛と 2 か月齢牛での回腸パイエル板での免疫系組織の発達を、各種 CD 抗原やサイトカインレセプターの発現でもって解析した。その結果、初生牛に比べて 2 か月齢牛では、 γ δ T 細胞のマーカーである T19 抗原や γ δ TCR 抗原の発現が旺盛であり、粘膜下領域において陽性細胞数の増加が観察された。また、WC6 や CD4 および CD8 においても 2 ヶ月齢牛でドーム領域から濾胞域で高い発現が観察された。

また、サイトカインレセプターの発現においても、CD25(IL-2R α)、IL-4R、IL-13R の発現は、初生牛に比べて、2 か月齢で極めて顕著であった(図 1)。

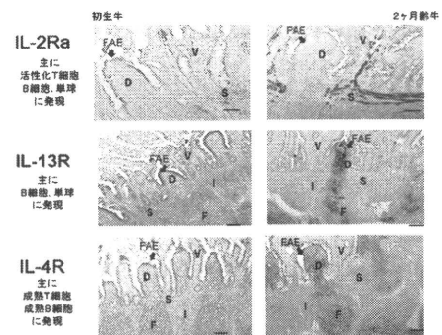


図1. 腸管での代表的なILレセプターの発現

これらの結果からして、初生牛に比べて2か月齢牛では、腸管での免疫系組織は外部の抗原等を受け入れて増殖・分化していることがうかがえる。

2) PrP^{Sc} 陽性神経細胞の樹立

神経細胞間での PrP^{Sc} 伝播用の PrP^{Sc} 陽性ドナー細胞を得る目的で、N2a-3 細胞へマウス感染チャンドラー株を添加して感染細胞を樹立した。感染細胞は PrP^{Sc} 添加後、細胞を3代継代することにより、感染細胞を得た。この PrP^{Sc} 感染細胞は、神経間伝達のドナー細胞として用いた。

3) 脾臓細胞から神経系細胞への PrP^{Sc} の伝播

スクレイピー感染マウスの脾臓内には、PrP^{Sc} が高率に蓄積されていることが明らかとなっている(図2)。

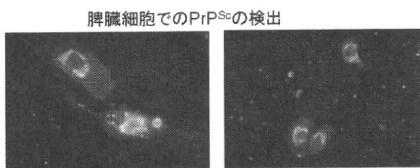


図2. 脾臓細胞での PrP^{Sc} の検出

免疫細胞から神経細胞への PrP^{Sc} の伝播を明らかにする目的で、感染マウスのリンパ系組織で PrP^{Sc} の蓄積が確認されている脾臓細胞をドナー細胞としてレシピエント細胞 N2a-3 への伝播を試験した。その結果、脾臓細胞とレシピエント細胞を単に混合して培養しただけでは、レシピエント細胞への伝播は、極めて低く、8代継代後から WB で僅かなバンドが検出され始め、9代でやっと検出できる程度の低い感染率であった。

一方、脾臓細胞をコンディショナル培地で活性化してレシピエント細胞と混合培養した場合、活性化しない場合と比べて、一過性の伝播の増加が観察された。しかし、安定した PrP^{Sc} 陽性の感染細胞を高率に得ることはできなかった(図3)

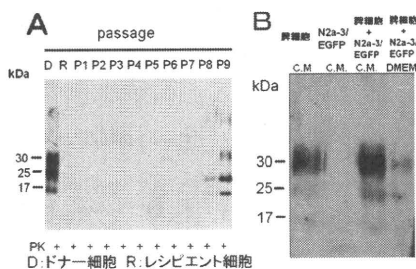


図3. 脾臓細胞から神経細胞への PrP^{Sc} の伝達試験

4) マウス Mφ 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み蓄積性が少ないことが明らかとなっている。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 6 時間取り込ませた後に、神経細胞 N2a-3/EGFP と混合培養した。培養時間は 48 時間行い、レシピエント細胞を9代継代培養し、レシピエント細胞内の PrP^{Sc} を WB 法にて検出したが、顕著なバンドは検出されなかった。

5) 神経細胞から神経細胞への PrP^{Sc} の伝達

PrP^{Sc} の細胞間の伝播を確認する目的で、神経細胞間での伝播実験を行った。ドナー細胞として PrP^{Sc} を発現している N2a-3 細胞とレシピエント細胞として N2a-3/EGFP 細胞を混合培養した。一定時間混合培養後、G418 を添加してドナー細胞を選択的に除去し、レシピエント細胞を継代培養して、PrP^{Sc} の蓄積性を WB 法を用いて検出した。混合培養後、5 回継代後のレシピエント細胞から PK 耐性の PrP^{Sc} が検出され、PrP^{Sc} の伝達が確認された(図4)。

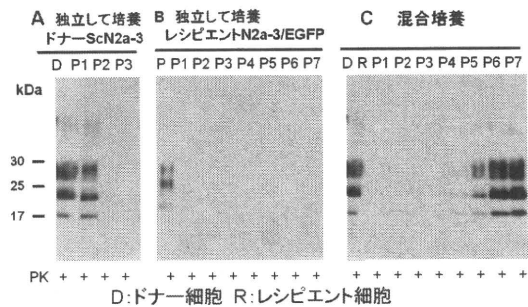


図4. 神経系細胞から神経系細胞への PrP^{Sc} の伝達試験

混合培養にて用いたドナー細胞、レシピエント細胞および混合培養にて得られた PrP^{Sc} 陽性のレシピエント細胞の性状を間接蛍光抗体法を用いて確認した(図5)。

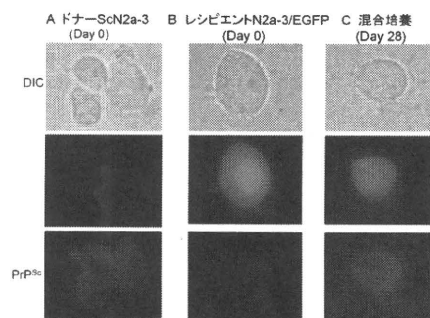


図5. 混合培養での PrP^{Sc} の伝達

次に、混合培養における伝播機構を解析する目的で、培養液を介した PrP^{Sc} の伝播の可能性につ