

201033007B

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

# 食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

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
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
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
山河 芳夫	国立感染症研究所・細胞化学部	再任用職員
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科・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. 総合研究報告書（平成20-22年度）	
食品を介するBSEリスクの解明等に関する研究	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. 研究成果に関する刊行一覧表	11

# I. 総合研究報告書

## 総合研究報告書

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 vCJD 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 様のシナプス型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。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。ま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。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 プリオン接種実験で病期の短縮がみられた。またプリオン産生に影響する宿主因子として LRP1 ほか、いくつかを同定した。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 プリオンを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。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。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）

山河芳夫（国立感染症研究所細胞化学部・再任用職員）

堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科・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）

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）

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 ヶ月で臨床上の変化が認められ、剖検直前には四肢の震えや起立困難等も観察できた。WB 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、肩甲骨上神経などの末梢神経系に PrP<sup>Sc</sup> が検出され、定型 BSE に比較し、早期に PrP<sup>Sc</sup> の末梢神経系への伝達が起こることが明らかとなった。定型 BSE と同様に、リンパ組織、筋肉などからは PrP<sup>Sc</sup> 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に、定型 BSE よりも早期に臨床的な行動変化が出現した(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 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 の発現が強くなり、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、またウエスタンブロットならびに免疫組織化学においても PrP<sup>Sc</sup> の明らかな蓄積は検出できなかった。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)。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。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 分子がプリオン病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。CD14 欠損(CD14<sup>-/-</sup>)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<sup>-/-</sup>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- $\beta$  は主にミクログリアと思われる CD11b<sup>+</sup>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<sup>-/-</sup>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- $\beta$  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、およびお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)。プリオンの産生に影響する宿主因子として Gabrb1 および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。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

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。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<sup>Sc</sup> の脳内での蓄積パターンおよび PrP<sup>Core</sup> 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<sup>Core</sup>) 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た。stone fence model(石垣モデル)を記載した。Hu129V/V マウスでは 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。コドン 129V/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、129V/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<sup>Sc</sup> の花弁状沈着が認められたのに対し、L-BSE 接種群では PrP<sup>Sc</sup> は薄く細顆粒状に存在し、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(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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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製作し、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<sup>Sc</sup> 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 <sup>20</sup>Asp<sup>95</sup>Gln<sup>96</sup>Gly<sup>100</sup>Ser<sup>116</sup>Ala<sup>132</sup>M<sup>225</sup>Ser<sup>226</sup>Gln 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斑はみられず、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の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. 研究成果に関する刊行一覧表

平成 20 年度 研究成果に関する刊行一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Song CH, Furuoka H, Kim CL, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M	Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice.	J Gen Virol	89	1533-44	2008
Ishiguro N, Inoshima Y, Sassa Y, Takahashi T	Molecular characterization of chicken prion proteins by C-terminal-specific monoclonal antibodies.	Vet Immunol Immunopathol	128	402-406	2009
Okemoto-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	357-365	2008
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
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	28	51-61	2008
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 panencephalopathic-type pathology.	Neuropathology	28	326-32	2008
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	369	1195-8	2008
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	28	645-51	2008
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	29 (4)	454-9	2009



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	116	561-566	2008
Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T	Human Prion Protein (PrP) 219K Is Converted to PrPSc but Shows Heterozygous Inhibition in Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Infection.	J Biol Chem	284	3603-09	2009
Yokoyama T, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S	Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models.	J Gen Virol	90	261-268	2009
Yokoyama T, Mohri S	Prion diseases and emerging prion diseases.	Curr Med Chem	15	912-916	2008
Yamamoto T, Ushiki Y, Hara S, Hall WW, Tsukagoshi-Nagai H, Yokoyama T, Tagawa Y, Sata T, Yamakawa Y, Kinoshita N, Tamura F, Hattori S, Irie S	An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue.	J Virol Methods	149	316-325	2008
Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Endo R, Tagawa Y, Ushiki-Kaku Y, Takenouchi T, Kitani H, Mohri S, Yokoyama T, Okada H	Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation.	J Neurochem	107	636-646	2008
Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Kitani H	Establishment of an SV40 large T antigen-immortalized bovine brain cell line and its neuronal differentiation by dibutyryl-cyclic AMP.	Cell Biol Int	33	187-191	2009
Murakami K, Nishikawa F, Noda K, Yokoyama T, Nishikawa S	Anti-bovine prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta isoform with high affinity.	Prion	2	73-80	2008
Suzuki SY, Takata M, Teruya K, Shinagawa M, Mohri S, Yokoyama T	Conformational change in hamster scrapie prion protein (PrP27-30) associated with proteinase K resistance and prion infectivity.	J Vet Med Sci	70	159-165	2008

Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B	Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking.	Nat Methods	5	211-212	2008
Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Tagawa Y, Kimura KM, Nakamura I, Wu G, Sakudo A, Casalone C, Mazza M, Caramelli M, Takahashi H, Sata T, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Onodera T	A monoclonal antibody (1D12) defines novel distribution patterns of prion protein (PrP) as granules in nucleus.	Biochem Biophys Res Commun	15	657-63	2008
Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T	Distinct immunohistochemical localization in Kuru plaques using novel anti-prion protein antibodies.	Microbiol Immunol	52	25-29	2008
Takada N, Horiuchi M, Sata T, Sawada Y	Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting.	J Vet Med Sci	70	1225-30	2008
Kato K, Sawada Y	Distribution of the lingual tonsils of cattle designated as specified risk materials.	J Vet Med Sci	70	251-254	2008
Muramatsu Y, Sakemi Y, Horiuchi M, Ogawa T, Suzuki K, Kanameda M, Hanh TT, Tamura Y	Frequencies of PRNP gene polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE.	Zoonoses Public Health	55	267-73	2008
Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, Watarai M	Heat shock cognate protein 70 contributes to Brucella invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion.	BMC Microbiol	8	212	2008
堀内 基広	プリオンの増殖とその抑制	ウイルス感染症セミナー	10	13-25	2008
Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, Doh-ura K, Go ML	Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quinacrine.	Bioorg Med Chem	16	6737-46	2008

平成 21 年度 研究成果に関する刊行一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	53	704-7	2009
Arai S, Matsui Y, Fukuda S, Okada H, Onoe S	Brainstem auditory evoked potentials in experimentally-induced bovine spongiform encephalopathy.	Res Vet Sci	87	111-4	2009
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	5918-27	2009
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	200-7	2009
萩原健一、山河芳夫、花田賢太郎	ヒト・プリオン病-感染症としての変遷と新たな課題	ウイルス	59	155-166	2009
Ishiguro N, Inoshima Y, Sassa Y, Takahashi T	Molecular characterization of chicken prion proteins by C-terminal-specific monoclonal antibodies.	Vet Immunol Immunopathol	128	402-6	2009
Lwin S, Inoshima Y, Ueno H, Ishiguro N	Uptake and transport of foreign particles in Peyer's patches of both distal ileum and jejunum of calves.	Cell tissue Res	337	125-135	2009
Atoji Y, Ishiguro N	Distribution of cellular prion protein in the central nervous system of the chicken.	J Chem Neuroanatomy	38	292-301	2009

Lwin S, Inoshima Y, Atoji Y, Ueno H, Ishiguro N	Immune cell types involved in early uptake and transport of recombinant mouse prion protein in Peyer's patches of calves.	Cell Tissue Res	338	343-354	2009
Sassa Y, Inoshima Y, Ishiguro N	Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE PrPSc.	Vet Immunol Immunopathol	133	33-39	2010
Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T	Human Prion Protein (PrP) 219K is converted to PrPSc but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection.	J Biol Chem	284	3603-9	2009
Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M	Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008.	Emerg Infect Dis	15	265-71	2009
Hiraga C, Kobayashi A, Kitamoto T	The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein.	Biochem Biophys Res Commun	382	715-19	2009
Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T	Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model.	Prion 2009	3	27-30	2009
Iwasaki Y, Kizawa M, Hori N, Kitamoto T, Sobue G	A case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the P105L prion protein gene mutation presenting with ataxia and extrapyramidal signs without spastic paraparesis.	Clin Neurol Neurosurg	111	606-9	2009
Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H	Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: Clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes.	Neuropathology	29	609-18	2009