

201131042A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

# 食品を介する伝達性海綿状脳症の リスクと対策等に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

平成 24 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

(北海道大学大学院獣医学研究科)

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

# 食品を介する伝達性海綿状脳症の リスクと対策等に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

平成 24 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

(北海道大学大学院獣医学研究科)

平成 23 年度 食品の安全確保推進研究事業  
「食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクと対策等に関する研究」班  
班員名簿

堀内 基広	北海道大学・大学院獣医学研究科・獣医衛生学教室	教授
石黒 直隆	岐阜大学・応用生物科学部・獣医学課程	教授
新 竜一郎	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野	准教授
北本 哲之	東北大学・大学院医学系研究・病態神経学分野	教授
坂口 末廣	徳島大学・疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門	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
堂浦 克美	東北大学・大学院医学系研究科・神経化学分野	教授
飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
萩原 健一	国立感染症研究所・細胞生化学部	第 1 室室長
福田 茂夫	北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部畜産工学グループ	研究主任
室井 喜景	帯広畜産大学畜産学部・基礎獣医学研究部門	助教
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
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	領域長補佐

## 目次

- I. 総括研究報告書（平成 23 年度）
  1. 食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクと対策等に関する研究・・・ 1  
研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）
  
- II. 分担研究報告書
  1. BSEKUS 株感染神経幹細胞の解析・・・ 9  
研究分担者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）
  
  2. 消化管構成細胞におけるプリオンの取り込み、増殖、細胞間伝播機構の解析・・・ 14  
研究分担者 石黒 直隆（岐阜大学・応用生物科学部）
  
  3. 食品および原材料に応用可能な高感度プリオン検出技術の開発と BSE の感染病態・増殖機構の解明・・・ 19  
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）
  
  4. ヒト型プリオン蛋白ノックインマウスを用いた vCJD の感染実験・・・ 22  
研究分担者 北本 哲之（東北大学・大学院医学系研究・病態神経学分野）
  
  5. プリオン感染による、細胞脆弱性の分子機序解明・・・ 25  
研究分担者 坂口 末廣（徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門）
  
  6. 霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究・・・ 29  
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）
  
  7. プリオン形成に関わる体内因子の解析・・・ 36  
研究分担者 堂浦 克美（東北大学・大学院医学系研究・神経化学分野）
  
  8. プリオンの細胞および組織における病理学的研究・・・ 39  
研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）
  
  9. 定型および非定型 BSE プリオンの蛋白質化学的な比較解析・・・ 43  
研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）
  
  10. 非定型 BSE 感染牛の臨床症状の客観的評価法の確立と非定型 BSE 感染牛の病態解析・・・ 47  
研究分担者 福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部）

11.	プリオン経口接種動物における垂直感染モデル作出の試み	50
	研究分担者 室井喜景 (帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門)	
12.	異常型プリオン蛋白増幅法 (PMCA) を用いた BSE 感染動物の病態解析	53
	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)	
13.	BSE 病態を反映する実験動物モデルの作出と評価	58
	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)	
III.	研究成果に関する刊行一覧表	63
IV.	研究成果の刊行物・別刷	71

# I. 総括研究報告書

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクと対策等に関する研究  
（H 2 3 -食品-一般-0 0 5）

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科

研究要旨

英国に端を発した定型 BSE は、適切な管理措置の導入とその遵守により、世界的に発生数は減少している。一方、家畜の伝達性海綿状脳症のサーベイランスの強化により、従来の定型 BSE とは異なる非定型 BSE や非定型スクレイピーの存在が明らかとなっている。定型 BSE の発生は管理下にあるが、食の安全安心に関してプリオン病は未だ社会的関心が高いこと、非定型 BSE や我が国に存在しない動物プリオン病への対策が必要なこと、プリオンの増殖・伝播機構や病態機序が依然として不明な点が多いことが不安要素となっていることから、本研究班では、平成 23 年度から、1) 非定型 BSE および動物プリオン病のヒトへのリスクの解明、2) BSE の起源の推定、3) プリオンの伝播・増殖機構および神経変性機構・発病機構の解明、4) 我が国に存在しない動物プリオン病への対策整備、の 4 項目について研究を開始した。

非定型 BSE 感染牛の臨床症状の記録および客観的な指標の探索を目的として、行動量の解析を行ったところ、非定型 BSE 感染牛では、夜間の安静時の行動量増加が特徴的であった。また、非定型 BSE はカニクイザルに高い再現性で感染が成立した。臨床症状および病理学的所見では、孤発性 CJD (sCJD) に類似した特徴が認められたことから、非定型 BSE の人へのリスクの解析に加えて、sCJD の有用なモデル系になると考えられた。非定型 BSE 感染サル由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅法(PMCA 法)の開発に着手し、超音波照射条件など増幅条件を検討した結果、PrP<sup>Sc</sup> の増幅効率が改善され、また BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> を迅速かつ感度良く検出する QUIC 法の再現性が使用する組み換えタンパクの保存方法により改善され、BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> の高感度解析系が整いつつある。これらを、BSE 感染動物の病態解析や BSE 病原体の性状の差異から定型 BSE の起源の推定に資する実験に応用可能となった。

BSE プリオン感染神経細胞で前シナプスマーカーの発現低下が生じることから、プリオン病における神経変性を解析する ex vivo モデルの候補となること、プリオン増殖を抑制する新規化合物グリコシド 9 の同定、トランスジェニックマウスを用いた解析から Periperin がプリオン病の病態の推移を促進させる因子として作用することの発見など、プリオン病の神経変性機構の解析のための新たな知見、新たな技術や素材の発見にも顕著な成果があった。

我が国に生息するシカの CWD サーベイランスでは現在まで陽性個体は発見されていないが、今後も継続して調査する。非定型スクレイピーへの対策に関しては、ノルウェーおよびドイツからの材料受け入れが可能となり、今後、検査方法等の検証に活用する。

研究分担者

程・教授)

石黒 直隆 (岐阜大学応用生物科学部・獣医学課

新 竜一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野・准教授）

北本 哲之（東北大学大学院医学系研究科・病態神経学分野・教授）

坂口 末廣（徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門・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）

堂浦 克美（東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野・教授）

飛梅 実（国立感染症研究所感染病理部・主任研究官）

萩原 健一（国立感染症研究所細胞生化学部・第1室室長）

福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場基盤研究部畜産工学グループ・研究主任）

室井 喜景（帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学研究部門・助教）

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）

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・領域長補佐）

## A. 研究目的

大きな社会問題となった定型 BSE は、飼料規制などの管理措置により発生は減少している。しかし、非定型 BSE、非定型スクレイピー、鹿の慢性消耗病など、性質が良くわかっていない伝達性海綿状脳症（プリオン病）が存在する。これら動物プリオン病の性状解析は、ヒトおよび動物への感染リスクを明らかにして拡大防止対策を講じる上で重要である。また、プリオン病の感染・発病

機構は依然として不明な点が多く、その解明は感染リスクの低減、および予防・治療法の開発に寄与する重要な課題である。また、北米や韓国で問題となっている鹿の慢性消耗病やヨーロッパで相次いで発見されている非定型スクレイピーなど我が国に存在しない伝達性海綿状脳症への対策にも備える必要がある。

これまでの研究では、定型 BSE プリオンの性質と病気の特徴の解明、診断法の開発と改良などを通じて、食品を介する BSE リスクの評価に必要な科学的知見の提示、およびリスクの低減に貢献してきた。しかし、新たなプリオン病の出現、発病機構が依然として不明なことなど、プリオン病に対する不安を払拭できない要素が残されていることから、さらなる研究の継続が必要である。

そこで本研究では、1) 非定型 BSE の病態および動物プリオン病のヒトへの感染リスクの解明、2) BSE の起源の推定、3) プリオンの伝播・増殖機構および神経変性機構・発病機構の解明、4) 我が国に存在しない動物プリオン病への対策整備、の4項目について研究を進める。

研究成果は、非定型 BSE や他のプリオン病の発生原因、病原学的特性、およびヒトや他の動物への伝播性などの科学的知見に基づいた、適切な管理措置の策定に貢献できる。また、プリオン汚染飼料、食品・薬粧品原料の排除による感染拡大リスクの低減に寄与する。従って、より高いレベルで食品を介する伝達性海綿状脳症のリスクの排除が可能となること、およびまた、国内で発生が確認されていない伝達性海綿状脳症に対する不安を払拭できることから、伝達性海綿状脳症のリスクに関する食品の安全確保、および食品衛生行政に大きく貢献する。ヒトプリオン病の早期診断法の確立、治療法の開発に必要な基礎知見を提供することから、食品衛生の分野のみならず広く厚生労働行政に貢献する。

## B. 研究方法

（1）非定型 BSE の病態および動物プリオン病のヒトへの感染リスクの解明

非定型 BSE 実験接種牛の臨床症状の詳細な記録、歩数計による行動量の測定、聴性脳幹反応測定を行い、臨床症状の客観的評価基準を作成する（福田）。非定型 BSE 実験接種牛の病変分布を、定型 BSE 感染牛と比較解析する（福田）。カニクイ



ザルに非定型 BSE 感染ウシ脳乳剤を接種して、運動機能試験、学習記憶解析を実施し、経時的に血液、尿、髄液を採取する。人道的エンドポイントに至ったサルは安楽殺し、MRI 所見を解析する。病理組織象および異常型 PrP の生化学性状を解析し、定型 BSE 感染サルと比較する(柴田、飛梅)。PMCA 法により BSE 感染サルにおけるプリオンの時間的・空間的分布を解析する(村山)。異なる遺伝子型のヒト PrP を発現するノックインマウスを用いた感染実験により、ヒトの動物由来プリオン病への感受性を評価する(北本)。定型および非定型 BSE を末梢投与したハムスターにおける病態解析を行い、BSE 感染モデルとしての有用性を評価する(横山)。

## (2) BSE の起源の推定

ウシ PrP<sup>Sc</sup>を検出するための QIUC 法の再現性および、感度を高めるための条件検討を行う(新)。非定型 BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup>を増幅するための PMCA 法の改良を行う(村山)。定型および非定型 BSE の異種動物への連続伝播実験を行い、病理組織学的特長、産生された異常型 PrP の糖鎖解析や蛋白分解酵素切断部位などの生化学的特性の比較解析から、定型および非定型 BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup>の性状の相違を明らかにする(萩原)。非定型 BSE 牛の脳乳剤を、種々の水分、油分および温度条件下で熱処理を行い、これを定型 BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup>増幅用の PMCA 反応にて増幅して、定型 BSE 様の性状を示す(堀内、福田)。

## (3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

プリオン感染動物脳における自然免疫系の反応を、遺伝子と蛋白の発現解析、および免疫組織化学により解析し、プリオンの増殖に応答するミクログリアとアストロサイトのクロストークと発病の関係を解明する(堀内、室井)。初代培養神経細胞にプリオンを感染させ、細胞変性が生じる条件を解析する(堀内)。免疫系および消化管上皮系細胞におけるプリオンの取り込みと増殖、細胞間伝播を解析する(石黒)。抗プリオン活性を有する化合物の作用機序をケミカルバイオロジー的アプローチにより解析し、予防・治療法の開発に役立つ(堂浦)。細胞死に関するシグナル伝達経路の解析からプリオン感染に伴う細胞脆弱性を解析する(坂口)。

## (4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

カナダ、アメリカ、および韓国の研究機関から CDW の発生状況について定期的に情報を収集する。平成 23 年にカナダ食品検査庁に赴き、直腸バイオプシーによる CWD 生前診断法を習得する(堀内)。北海道(堀内)および本州(横山)で CWD モニタリングと PrP 遺伝子解析を実施する。ノルウェイから非定型スクレイピー検体の提供を受け、検査法の適正化を図る(堀内)。

## (倫理面への配慮)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコル等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱いは、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1) 非定型 BSE の病態および動物プリオン病のヒトへの感染リスクの解明

1-1) 脳内接種による非定型 BSE 感染牛を作出し、臨床症状の記録、行動量測定、聴性脳幹誘発電位(BAEP)測定を行い、臨床症状の客観的評価に資するデータを作成するため、非定型 BSE (L型: BSE/JP24 Serial) (n=2) または定型 BSE (BSE/JP05) (n=1) の 10% BSE 感染脳乳剤をそれぞれ 1ml 脳内接種し BSE 感染牛を作出した。接種前に BAEP を測定したところ、波間潜時は I-III 間  $2.03 \pm 0.12\text{ms}$ 、III-V 間  $1.05 \pm 0.12\text{ms}$ 、I-V 間  $3.08 \pm 0.11\text{ms}$  で成牛とほぼ同じ値であった。また、非定型 BSE 接種牛の接種後 15 ヶ月時の行動量解析を行ったところ、夜間における行動が認められた(福田)。

1-2) ヒトの 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) の接種を行い、継続的なサンプリングとともに、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、潜伏期は短縮され、再現性の高い vCJD 早期発症系モデルが確立できた。L-BSE 接種カニク

イザルにおいても、高い再現性で発症が認められた。臨床症状および病理学的所見では、孤発性CJD (sCJD) に類似した特徴が認められたことから、非定型BSEの人へのリスクの解析に加えて、sCJDの発症機序解明、早期診断系確立および治療研究に非常に有用なモデル系になると考えられた。発症カニクイザルのMRI画像によるボリューム解析と病理組織像における空胞変性領域との間に相関が認められたことから、空胞変性が脳の委縮に関与していることが示唆された(柴田、飛梅)。

また、C-BSE経口投与サルにおけるPrP<sup>Sc</sup>の体内分布・動態をPMCA法により解析した。定型BSE経口投与後7.5年を経過して未発症であったカニクイザルにおいて、PrP<sup>Sc</sup>の体内分布を網羅的に解析した結果、深頸リンパ節、脾臓、延髄、血漿、回腸から極微量のPrP<sup>Sc</sup>を検出した。したがってこのサルでは感染は成立しており、いずれ発症に至った可能性が高い。また、未発症サルの血液からPrP<sup>Sc</sup>が検出されたことは、霊長類でも血液を用いた早期診断が可能であることを示唆している。経口および輸血接種後5~8年経過を観察している動物の解析を行うことは、受動的感染リスクによるプリオン病発症機序解明に貴重な資料と考えられる。

1-4) 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たvCJDプリオンの感染実験により、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。また、非定型BSEのヒトへのリスクの解析、および非定型BSE感染サルから病原体のトレースバックが可能であるかを調べるために、アミノ酸型の異なるヒトPrPノックインマウスを用いる感染実験を進める。

## 2) BSEの起源の推定

2-1) BSE由来PrP<sup>Sc</sup>の高感度検査法を開発するため、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た。組み換えウシPrP (rBoPrP) を37°Cで1週間程度保温すると、real-time QUIC法の検出感度がBSE感染牛由来脳乳剤の希釈系列で2桁上昇することが判明した。この感度上昇によりBSE感染牛由来髄液中のPrP<sup>Sc</sup>を検出することが可能となった。今後、この方法を非定型BSE由来PrP<sup>Sc</sup>の高感度検出に応用する。

2-2) 非定型BSE感染サル由来PrP<sup>Sc</sup>の高感度検出法の開発に着手し、超音波照射条件など増幅条件を検討した結果、PrP<sup>Sc</sup>の増幅効率が改善できたことから、来年以降は非定型BSE感染サルの組織におけるPrP<sup>Sc</sup>の分布の解析を進めることが可能となった(村山)。BSEの高感度増幅法であるPMCA法をより一般化するために、複数の研究機関で一定以上の感度で実施できるような技術移転や標準化であるが、動物衛生研究所の技術指導により新得畜産試験場で満足できる感度でBSE由来PrP<sup>Sc</sup>を検出するPMCA法が実施できるようになり、今後、この方法をBSEの起源の推定に応用可能となった(福田)。

2-3) 非定型BSEでは、ウエスタンブロット分析により検出されるPrP<sup>Sc</sup>分子うち1糖鎖型の構成比が高いという蛋白質化学的な特徴をもつことから、非定型BSEプリオンの1糖鎖型PrP<sup>Sc</sup>の糖鎖修飾について解析を進めた。C-BSE (JP6) でも非定型BSE (JP24) でも、1糖鎖型PrP<sup>Sc</sup>は主にAsn208に糖鎖修飾が起きていることを示唆するデータが得られ、両者の差は認められなかった。

## 3) プリオンの伝播・増殖機構および発病機構の解明

3-1) プリオンの感染・増殖により神経細胞の変性を再現できる培養細胞実験系の構築を目的として、分化Neurospheresに各種プリオン株を接種して、感染動態を調べた。用いたプリオン株のうち、BSE由来のBSEKUS株は、分化Neurospheresの神経細胞に感染し易い傾向があること、また、BSEKUS株が感染した神経細胞では前シナプスマーカーであるsynaptophysinの発現が低下したことから、BSEKUS株と分化Neurospheresの組み合わせはプリオンの増殖により生じる神経細胞の変性機構の解析に応用できる可能性があることが示唆された(堀内)。

3-2) 腸管でのプリオンの取り込みや蓄積を想定して、マウスの各種培養細胞15種類を用いてプリオンの取り込み、分解、蓄積能を解析した。短期培養では、各細胞の性質により、添加したPrP<sup>Sc</sup>の多くが分解されていくのに比べて、長期培養では、いったん分解してPrP<sup>Sc</sup>の蓄積が消失した細胞で21日を過ぎたぐらいから再蓄積することが確認されて、培養細胞でのプリオンに対する反応性の違いが明らかとなった(石黒)。

3-3) プリオンを制御する細胞環境を明らかにする新たなツールとして市販のグリコシド化合物をプリオン持続感染細胞を用いて探索したところ、グリコシド-9 と呼んでいる化合物がプリオン形成を抑制することを発見した。類似の化学構造を持つものも調べたが、ピラノースの6位にベンジル基を持つことがプリオン形成抑制に必要な化学構造の一部と考えられた。正常型プリオン蛋白代謝への影響や細胞膜の脂質ラフトマイクロドメインへの影響を調べたところ、グリコシド-9 は正常型プリオン蛋白の細胞内局在量を減少させ、細胞膜の脂質ラフトマイクロドメインの量を減少させることが明らかとなった(堂浦)。

3-4) 22L プリオン感染マウス神経芽細胞(N2aC24L1-3)がプロテアソーム阻害剤 MG132 に脆弱で、コントロールの非感染細胞(N2aC24)より有意に、カスパーゼ経路を介したアポトーシスによる細胞死を起こす事を見出した。また、N2aC24 や cured N2aC24L1-3 は MG132 添加後、M 期まで進行して細胞周期が停止するのにもかかわらず、N2aC24L1-3 は G2 期で停止する事を見出した。この結果は、MG132 によりプリオンの細胞毒性が表面化し、G2/M 期関連分子に影響を与え、細胞周期を G2 期で停止させ細胞死を誘導する可能性を示している(坂口)。

3-5) プリオン感染に感受性・非感受性培養細胞の比較検討から同定された peripherin のプリオン病病態への関与を解析するため、CAG プロモーターにより発現される peripherin 強発現トランスジェニックマウスを作製し、プリオン感染と病態推移に与える影響を検討した。peripherin トランスジェニックマウスではプリオン病態の進行が促進することが明らかとなった。

#### 4) 我が国に存在しない動物プリオン病の対策整備

4-1) 北海道と本州に生息するシカの CWD モニタリングと PrP 遺伝子型の決定を行った。北海道では、道東および道央から、エゾシカ用簡易と殺場で処理された 40 頭を調べたが、CWD は陰性であった。また、計 6 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。エゾシカ CWD 感受性は不明であるが、エゾシカは他の鹿科動物で CWD 感受性であると報告されているア

ミノ酸多型を有していることが示唆された(堀内)。また、カナダ食糧庁に赴き、直腸バイオプシーによる CWD 生前診断法を習得する予定であったが、これは平成 24 年度に実施する。

4-2) 非定型スクレイピー株の輸入について、ノルウェー獣医研究所の Dr. Benestad およびオスロ大学の Dr. Press と連絡を取り、羊スクレイピー Nor98 の中枢神経系材料の提供を受けることになった。また、Dr. Groshup からドイツで発生した非定型スクレイピーの材料の提供を受けることになった。材料の到着は平成 24 年度になる(堀内)。

#### D. 考察

非定型 BSE 感染牛の臨床症状は、定型 BSE 感染牛ほど顕著ではなく、発病後の経過も早いことから、非定型 BSE 感染牛の臨床症状を的確に判断することは重要であるので、本年度新たに非定型 BSE、定型 BSE を接種した牛を用いて比較解析を進める。また、非定型 BSE 感染牛で夜間安静時の行動量が多く、昼間の行動量が低い傾向が認められたことは、興味深い。一例の解析のみであるので、今後、例数を増やすと共に、定型 BSE でも同様の解析を進める。

非定型 BSE がカニクイザルに再現良く感染することから、非定型 BSE のヒトへのリスクを解析する実験系として有用であると同時に、その神経病態は sCJD に似ることから、sCJD の霊長類モデルとして有用と考えられる。また、定型 BSE を経口投与して 7 年を経過するカニクイザルの末梢組織および延髄から微量であるが PMCA 法で PrP<sup>Sc</sup> が検出されたことから、サルを用いた BSE リスクの評価には長期間の経過観察が必要であることが改めて認識された。

非定型 BSE 感染サル組織から PrP<sup>Sc</sup> を増幅する PMCA 法の感度が向上したことから、今後病態解析が進むとともに、同条件は非定型 BSE 感染牛組織からの PrP<sup>Sc</sup> の増幅感度の向上にも応用できる可能性がある。また、PMCA とは異なる原理により PrP<sup>Sc</sup> を増幅・検出する QUIC 法では、再現性および感度良く PrP<sup>Sc</sup> を検出するための、rBoPrP の保存条件が見つかった。今後、これを非定型 BSE 感染牛組織からの PrP<sup>Sc</sup> の検出に応用していく。

種々のアミノ酸型のヒト PrP を発現するノックインマウスは、非定型 BSE のヒトへの感染リスクや、非定型 BSE のトレースバック実験に有用であ

ることから、来年度以降に感染実験を進める。

BSE 由来プリオン株 KUS が他のプリオン株と比較して、培養細胞系で初代神経細胞に感染し易く、感染した神経細胞で前シナプスマーカーの発現が低下したが、前シナプスマーカーの発現低下はプリオン感染動物の中樞神経系で認められることから、この実験系がプリオン感染による神経変性機構を解析する *ex vivo* の実験系となることが期待される。

プリオンを制御する細胞環境を明らかにする新たなツールとしてグリコシド9を発見した。この化合物は、細胞膜の脂質ラフトマイクロドメインの量を減少させるとともに正常型プリオン蛋白の細胞内局在量を減少させ、プリオンの形成を抑制した。グリコシド化合物の作用に関わる分子群の解明により、プリオン制御にかかわる細胞環境を明らかにできることが期待される。

Peripherin トランスジェニックマウスを用いた感染実験から、peripherin はプリオン病の病態の推移を促進すると考えられたが、培養細胞を用いた研究では peripherin はプリオンの細胞内への取り込みを増強することから、その機序として、プリオンの効率的な取り込みが関与すると考えられるが、組織における感染価の推移や病変形成などの詳細な解析が必要である。

我が国に生息するシカにおける CWD サーベイランスでは、これまで陽性個体が発見されていないが、特に北海道ではエゾシカ肉の食用利用を促進する動きがあり、CWD の存在を懸念する意見が多いことから、今後も、エゾシカ用簡易と殺場で処理され食用利用されるシカを対象に CWD サーベイランスを継続する。また、非定型スクレイピーの材料が入手可能でき次第、現行の羊スクレイピー検査法の非定型スクレイピーの検出感度等を調べ、TSE サーベイランスの一環として採材検査された過去の保管材料の再検査を実施する。

## E. 結論

非定型 BSE 感染牛では、夜間の安静時の行動量増加が特徴的であった。また、非定型 BSE はカニ

クイザルに高い再現性で感染が成立し、非定型 BSE の人へのリスクの解析に加えて、sCJD の有用なモデル系になると考えられた。非定型 BSE 感染サル由来 PrP<sup>Sc</sup> の増幅法(PMCA 法)の増幅効率が改善され、BSE 由来 PrP<sup>Sc</sup> を検出する QUIC 法の再現性が改善されたことから、これらを、BSE 感染動物の病態解析や BSE 病原体の性状の差異から定型 BSE の起源の推定に資する実験に応用可能となった。

BSE プリオン感染神経細胞が、プリオン病における神経変性を解析する *ex vivo* モデルの候補となること、プリオン増殖を抑制する新規化合物グリコシド9の同定、および Peripherin がプリオン病の病態の推移を促進させる因子であることを明らかにした。

我が国に生息するシカの CWD サーベイランスでは現在まで陽性個体は発見されなかった。非定型スクレイピーへの対策に関しては、ノルウェーおよびドイツからの材料受け入れが可能となった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

各研究分担者の報告書を参照

### 2. 学会発表

各研究分担者の報告書を参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

## II. 分 担 研 究 報 告 書

# 1. BSEKUS 株感染神経幹細胞の解析

研究分担者 堀内 基広 北海道大学大学院・獣医学研究科

研究協力者 佐々 悠木子 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

## 研究要旨

プリオン病は神経変性を特徴とするが、プリオンの感染により神経細胞の変性を再現できる細胞培養系は殆ど報告がない。このことがプリオン病における神経細胞の変性機序の解析が進まない要因の一つとなっている。本研究では、プリオンの感染・増殖により神経細胞の変性が再現できる培養細胞系の確立を目的として、神経幹細胞 (Neurospheres) におけるプリオンの感染を詳細に解析した。Neurospheres を分化させた後に各種プリオン株を接種したところ、Chandler 株、22L 株、Obihiro 株は分化後日数に関係なく neurospheres に感染した。PrPSc 陽性となる細胞の大部分は GFAP 陽性細胞であったが、PrPSc が MAP2 および  $\beta$  TubulinIII 陽性の神経細胞でも検出された。一方、Fukuoka-1 株と BSEKUS 株は分化後 30 日以降に感染させた場合に neurospheres に感染した。特に BSEKUS 株では、他の株と比較して MAP2 および  $\beta$  TubulinIII 陽性神経細胞で PrPSc が検出される傾向が認められた。PrPSc は細胞体、軸索、および樹状突起で認められた。また、PrPSc が検出される細胞は、前シナプスマーカーである synaptophysin の発現が低い傾向が認められた。BSEKUS 株は分化 neurospheres 培養系で神経細胞に感染することから、プリオン感染による神経変性機構を解析する細胞培養系として応用できる可能性がある。

## A. 研究目的

プリオン病の神経病理学的特長の一つは神経細胞変性、脱落である。しかし、プリオンの増殖により神経細胞が変性する分子機構は不明な点が多い。プリオンの増殖に伴い神経細胞が変性する機構を詳細に解析するには、神経細胞の変性を再現できる培養細胞系が必須であるが、これまで、培養細胞系でプリオン感染により神経細胞の変性が生じることを報告したは例は極少数である。従って、プリオンの感染により神経細胞の変性が生じる再現性の高い実験系の確立は、プリオン病の研究、特に神経変性機構の解析を進めるブレイクスルーとなる。これまでプリオンの増殖機構の解析には神経芽細胞や神経組織由来株化細胞が用いられてきたが、このような株化細胞ではプリオンは持続感染するものの、顕著な神経変性は認められない。そこで、本研究では初代培養神経細胞を用いてプリオン感染による神経細胞の変性を再現できる培養系の確立を目的とした。

## B. 研究方法

### 1) Neurospheres の培養

胎齢 13-15 日の脳を機械的に分散させ、N2 サプリメント、EGF、および FGF-2 を添加した DMEM/F12 を用いて培養し、neurospheres を分離した。Neurospheres をポリエチレミンをコートしたチャンバースライドに播種し、N2 サプリメント、レチノイン酸を含む N27 サプリメント、および FBS を含む DMEM/F12 で培養することで分化させた。Neurospheres は分化後 120 日以上維持可能であった。

### 2) プリオン株とプリオンの接種

Chandler 株、22L 株、Obihiro 株、G1 株、Fukuoka-1 株、および BSEKUS 株を使用した。各種プリオン感染マウスの脳乳剤(0.2%)を Neurospheres に接種して 2 時間培養した。その後培養液を交換してさらに培養を続けた。

### 3) 蛍光抗体法

mAb132 を用いる PrPSc 特異的染色は既報に従って実施した(Yamasaki et al.)。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている(実験番号 2011-1-47, 48)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会で承認された動物実験計画書(実験番号 11-0062, 11-0063)に従って実施した。

### C. 研究結果

#### 1) プリオン感染 Neurospheres での PrP<sup>Sc</sup> の検出

Chandler 株あるは 22L 株接種後の Neurospheres から、PrP<sup>Sc</sup> を mAb132 を用いた PrP<sup>Sc</sup> 特異的蛍光抗体法、セルブロット、およびウエスタンブロットにより検出した(図 1)。プリオン感染 neurospheres では、非感染 neurospheres(Mock)では検出されない顆粒状の PrP<sup>Sc</sup> 染色像が認められ、また、セルブロットでも PK 抵抗性の PrP<sup>res</sup> が接種後の時間経過とともに検出された。また、ウエスタンブロットでも PrP<sup>res</sup> に特長的な 3 本のバンドが検出されたことから Neurospheres にプリオンが感染して増殖することが確認できた。

#### 2) プリオンが感染する細胞種の解析

分化 Neurospheres には、MAP2 陽性の神経細胞、GFAP 陽性のアストロサイト様細胞、OSP 陽性のオリゴデンドロサイト様細胞、NG2 陽性の NG2 グリア細胞、および Nestin 陽性細胞が含まれる。どの細胞にプリオンが感染するかを調べるため、各種マーカーと PrP<sup>Sc</sup> の二重染色により解析した。最も顕著に PrP<sup>Sc</sup> が顕著に検出される細胞は GFAP 陽性細胞であったが、MAP2 陽性細胞、OSP 陽性細胞、NG2 陽性細胞、および Nestin 陽性細胞でも PrP<sup>Sc</sup> は検出された。分化 Neurospheres は上記の構成細胞、特に GFAP 陽性細胞が密接に入り組んだ培養状態にある。そこで、PrP<sup>Sc</sup> が MAP2 陽性細胞に存在することを確認するために、Z-stack で画像を取得して画像を 3 次元構築した。PrP<sup>Sc</sup> の一部は MAP2 および  $\beta$  Tublin-III が陽性となる領域の内部に存在することから、PrP<sup>Sc</sup> が神経細胞にも存在することが確認できた。

#### 3) 分化 Neurospheres のプリオン感受性

分化 Neurospheres のプリオン感受性を調べるために、計 6 種類のプリオン株を用いた(Chandler 株、22L 株、Obihiro 株、G1 株、Fukuoka-1 株、お

よび BSEKUS 株)。分化後 10 日目に接種した場合、Chandler 株、22L 株、Obihiro 株、および G1 株でを接種した Neurospheres で、PrP<sup>Sc</sup> 特異染色により PrP<sup>Sc</sup> 陽性となった(図 2)。一方、BSEKUS 株と Fukuoka-1 株では、分化後 30 日以降に接種した場合に PrP<sup>Sc</sup> が検出されるようになった(図 2)。従って、使用する株により、Neurospheres 分化後の接種時期により感受性は異なる場合はあるが、使用した 6 種の株すべてが、Neurospheres に感染することが確認できた。

4) BSEKUS 株は分化 Neurospheres の神経細胞で増殖する。

プリオン感染 Neurospheres を、各種細胞のマーカー分子と mAb132 を用いた PrP<sup>Sc</sup> 特異的染色により詳細に観察していると、他のプリオン株と比較して、BSEKUS 株が感染した Neurospheres では PrP<sup>Sc</sup> が MAP2 および  $\beta$  Tublin-III 陽性の神経細胞で検出される傾向が認められた。図 3 に示すように、細胞体に加えて、軸索あるいは樹状突起様の構造に沿って PrP<sup>Sc</sup> の顆粒状の染色が連続して認められ。他の株でも注意深く観察すると、PrP<sup>Sc</sup> が神経細胞で検出されるが、BSEKUS 株では、その様子が明瞭に認められた。

5) BSEKUS 株感染神経細胞での synaptophysin の発現

BSEKUS 株が分化 Neurospheres の神経細胞に感染することが判明したので、PrP<sup>Sc</sup> 陽性神経細胞と PrP<sup>Sc</sup> 陰性神経細胞の細胞体および軸索あるいは樹状突起様の構造での synaptophysin の発現を、神経細胞マーカー分子に対する抗体、抗 synaptophysin 抗体、および mAb132 を用いた蛍光三重染色により解析した(図 4)。その結果、PrP<sup>Sc</sup> が検出される神経細胞および軸索あるいは樹状突起様の構造では、synaptophysin の発現が低い、殆ど発現していなかった。

### D. 考察

プリオン病における神経変性機構を分子レベルで解析するためには、細胞培養系で神経細胞の変性が再現できる実験系の確立が必須である。そこで、本研究では初代神経培養細胞の使用を考え、神経細胞を長期間培養できる分化 Neurospheres を用いた。分化 Neurospheres の培養系に含まれる 60%程度が GFAP 陽性細胞であり、Chandler 株、

22L 株、および Obihiro 株は主に GFAP 陽性細胞に感染することが判明した。しかし、BSEKUS 株の分化 Neurospheres への感染状態は、これらの株とは 2 つの点で大きく異なっていた。第一に、BSEKUS 株は分化後 30 日以降の Neurospheres に接種した場合に感染が成立するようになること、第二に神経細胞にも感染することである。BSEKUS 株を接種した分化 Neurospheres でも GFAP 陽性細胞でも PrPSc は検出されるが、細胞体および軸索(あるいは樹状突起)様の構造に沿って PrPSc の顆粒状の染色が連なって観察される点は他のプリオン株とは異なっていた。また、PrPSc が陽性の神経細胞では前シナプスマーカーの一つである synaptophysin の発現が低い傾向が認められた。プリオン感染マウスの脳でも、プリオンの増殖に伴い synaptophysin の発現が低下することが知られている。従ってこの結果は、BSEKUS 株の感染により、神経細胞の機能が何らかの障害を受けて、synaptophysin の発現が低下する可能性を示唆している。一方、synaptophysin の発現が低いあるいはない神経細胞に BSEKUS 株が感染し易い可能性もあることから、今後プリオンの感染と、synaptophysin 以外の他のマーカー分子を含めて、発現の変化を詳細に解析する必要がある。

## E. 結論

プリオンの感染・増殖により神経細胞の変性を再現できる培養細胞実験系の構築を目的として、分化 Neurospheres に各種プリオン株を接種して、感染動態を調べた。用いたプリオン株のうち、BSE 由来の BSEKUS 株は、分化 Neurospheres の神経細胞に感染し易い傾向があること、また、BSEKUS 株が感染した神経細胞では前シナプスマーカーである synaptophysin の発現が低下したことから、BSEKUS 株と分化 Neurospheres の組み合わせはプリオンの増殖により生じる神経細胞の変性機構の解析に応用できる可能性がある。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Song C.-H., Honmou, O., Furuoka, H. and Horiuchi, M. Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone

marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions. *J. Virol.*, 85: 11069-11078, 2011

- 2) Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R. and Horiuchi, M. Characterization of intracellular localization of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells using monoclonal antibody that recognizes the region consisting of amino acids 119-127 of mouse PrP. *J. Gen. Virol.*, 93: 668-680, 2012
- 3) Hasebe, R., Raymond, G. J., Horiuchi, M., and Caughey, B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology*, 423: 205-213, 2012
- 4) Yoshikawa, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Kadohira, M., Kai, S., Mizusawa, H., Nagata, C., Onodera, T., Sata, T., Tsutsui, T., Yamada, M., and Yamamoto, S. Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, in press

## 2. 学会発表

- 1) Hasebe, R., Sakai, K., Song, C.-H., and Horiuchi, M. Involvement of CD14 in the early neuropathogenesis of prion disease. Prion2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 2) Takahashi, Y., Song, C.-H., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Immunohistochemical analysis of PrP<sup>Sc</sup> accumulation and activation of astrocytes and microglia in early stage of prion infection. APPS2011 (July, 10-11, 2011, Karuizawa, Japan)
- 3) Yamasaki, T., Baron, G.S., and Horiuchi, M. Detection of newly generated PrP<sup>Sc</sup> in Neuro2a cells inoculated with fluorescent-dye labeled purified PrP<sup>Sc</sup>. XV International Congress of Virology (Sept, 11-16, 2011, Sapporo, Japan)
- 4) Sassa, Y., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Characterization of prion infection in differentiated mouse neurospheres. XV International Congress of Virology (Sept, 11-16, 2011, Sapporo, Japan)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし



2. 実用新案登録  
該当なし

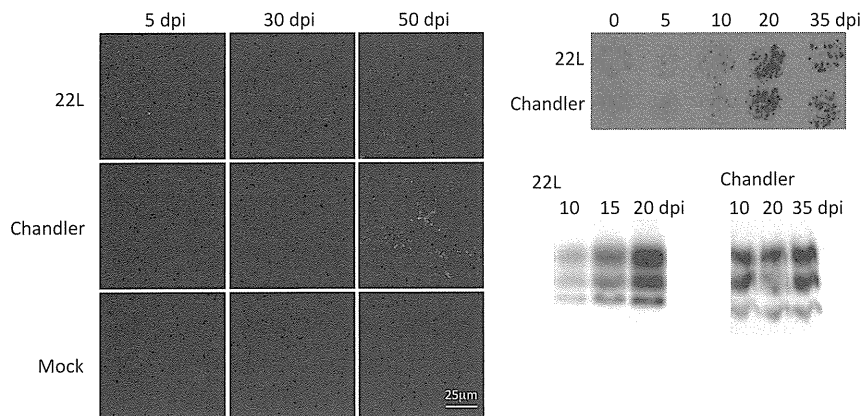


図1. プリオン感染 Neurospheres の解析

22L あるいは Chandler 株を接種後、5、30、50 日後に PrPSc 特異的蛍光抗体法により PrPSc を検出した (左)。また、接種後 0、5、10、20、35 日後に cell blot により (右上)、あるいはウェスタンブロットにより (右下) Proteinase K 抵抗性の PrP-res を検出した。

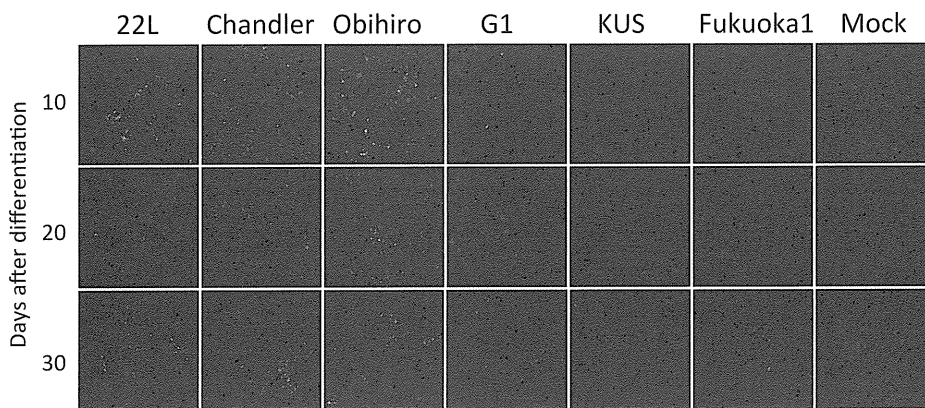


図2. Neurospheres の各種プリオン株に対する感受性

写真左に示した分化後日数で、上に示したプリオン株を接種した。接種後 30 日の時点で PrPSc 特異的蛍光抗体法により PrPSc を検出した。

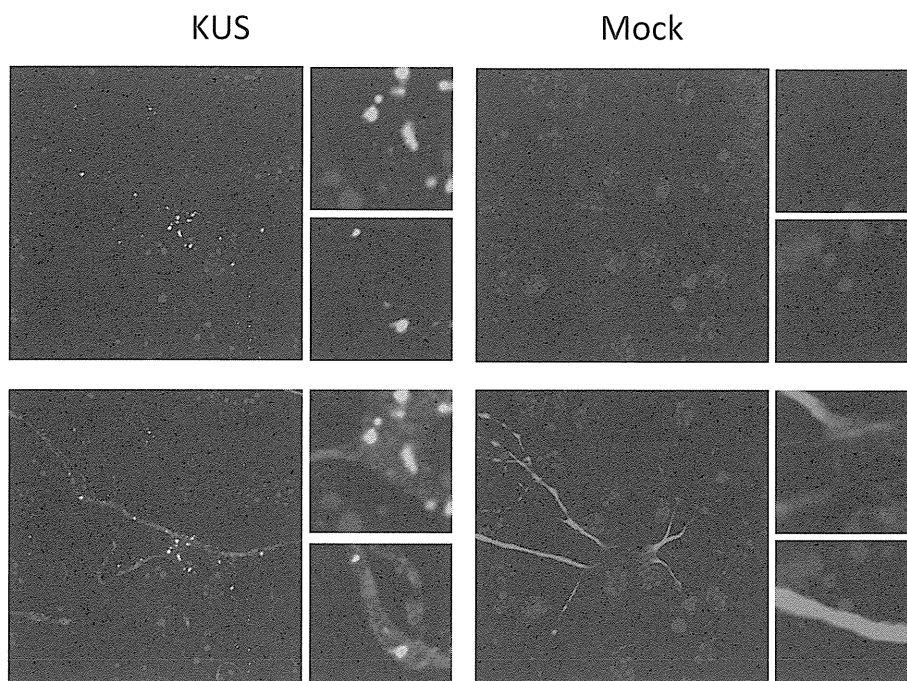


図 3. BSEKUS 株感染 Neurospheres における PrPSc の局在

PrPSc の顆粒状の染色が、MAP2 および  $\beta$  Tublin-III 陽性の神経細胞 (赤) の細胞体および樹状突起で検出されるが、非感染 Neurospheres (Mock) では認められない。

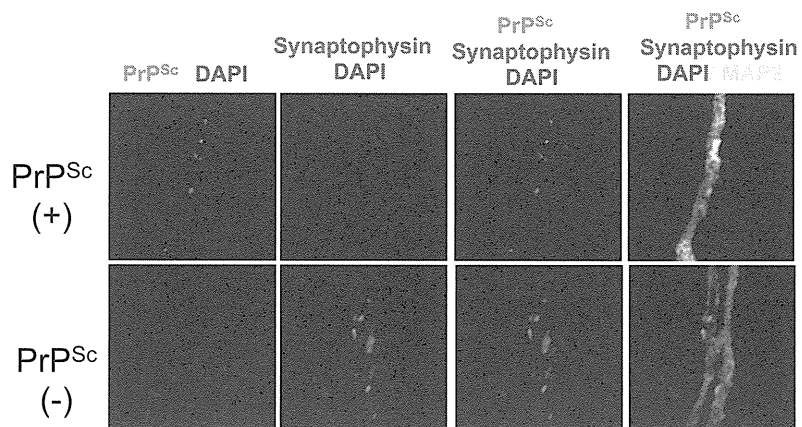


図 4. BSEKUS 株感染神経細胞における synaptophysin の発現

PrPSc 陽性の神経細胞 (樹状突起) (上段) と PrPSc 陰性の神経細胞 (樹状突起) (下) における synaptophysin の発現 (赤) を調べた。MAP2 および  $\beta$  Tublin-III 陽性の神経細胞は白で示す。

## 2. 消化管構成細胞におけるプリオンの取り込み、増殖、細胞間伝播機構の解析

研究分担者 石黒 直隆 岐阜大学・応用生物科学部

研究協力者 エル・ヘラリー (岐阜大学 大学院連合獣医学研究科)

### 研究要旨

牛海綿状脳症やスクレイピの侵入部位とされる小腸パイエル板の消化管構成細胞でのプリオンの取り込み能、分解能、蓄積能を明らかにする目的で、マウス由来の 15 種類の培養細胞を用いてマウスプリオンの Chandler 株や Obihiro 株に対する細胞の反応性を解析した。5 日間の短期培養においては、細胞の種類によりプリオンの取り込み能、分解能がそれぞれ異なっていた。各種細胞のプリオンに対する反応性は、細胞が産生する PrP<sup>C</sup> 発現、プロテアゾーム活性などに影響していることが明らかとなった。プリオンを感染したほとんどの培養細胞は、経時的にプリオンを分解するが、感染細胞を長期間培養すると、細胞内にプリオンが再度蓄積してくることが明らかとなった。また、蓄積したプリオンは、神経細胞へも伝播が可能であった。長期培養でのプリオンの再出現は、プリオン病の発症機構を考える上で有用な示唆を与えるものと考えられる。

### 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(PrP<sup>Sc</sup>)は、経口的に取り込まれた後、腸管から生体に侵入すると考えられている。特に、腸管腔から活発にいろいろな物質等を取り込む小腸パイエル板やその周辺の神経組織が、プリオン感染初期の蓄積組織となっている。実際にプリオン感染動物の小腸パイエル板や濾胞あるいは神経組織でプリオンの蓄積が確認される。パイエル板の濾胞内でプリオンを保有している細胞の多くは、マクロファージ、樹状細胞、濾胞樹状細胞などのリンパ系細胞である。しかし、小腸パイエル板は、リンパ系細胞ばかりではなく、多くの細胞群から構成されている。プリオンが腸管腔からパイエル板内に取り込まれるドームの M 細胞周辺には、リンパ系細胞以外の多くの細胞群が存在しており、腸管腔からの物質の取り込み、分解、輸送に深く関わっている。しかし、こうした細胞でのプリオンの取り込みや分解および蓄積に関しては明らかになっていない。

本年度は、小腸パイエル板を構成すると考えられる各種細胞において、プリオンの取り込みや蓄積、分解を明らかにする目的で、マウス由来の各種細胞 15 種類に関して、プリオン添加後の細胞

内の取り込みと分解を解析した。本年度の研究で、感染させたプリオンに対して、細胞自身が産生する PrP<sup>C</sup> 発現量と分解能が細胞のプリオン蓄積能に大きく影響していることを明らかにした。また、短期間の培養に比べて、培養細胞を長期間維持すると、消失したと思われたプリオンが、培養 3 週間目位から徐々に蓄積し、細胞内に長期間維持されていることが明らかとなった。

### B. 研究方法

#### 1) 組織培養細胞とプリオン株

本実験に使用した組織培養株は、免疫系 6 細胞 (RAW, J774, P338-D1, IL-1, EL4, J588L)、神経系 5 細胞 (N2a-3, NB41A3, GT1-7, RT4-D6P2T, TR6Bc1), 腸管上皮系細胞 (IEC-18), その他の細胞 (P1.HTR, NIH-3T3, HeLa) の計 15 細胞である。ヒト由来 HeLa 細胞を除いて、他 14 種類の培養細胞は、マウスあるいはラット由来である。免疫系の 3 細胞 RAW, J774, P338-D1 は、マクロファージであり、EL4 は T 細胞である。N2a-3 と NB41A3 は Neuroblastoma 由来であり、RT4-D6P2T と TR6Bc1 は Schwannoma 由来である。また、P1.HTR 細胞は Mastocytoma 細胞由来である。細胞の培養

液として 10%FCS 加 DMEM を用いた。

プリオン株として Chandler 株と Obihiro 株を用いた。両株とも感染マウスの発症末期の 10%脳乳剤を培養細胞に添加することにより細胞に感染させた。

## 2) 短期培養と長期培養での培養細胞の PrP<sup>Sc</sup> の取り込みと分解能の解析

各種細胞は、6cm シャーレで培養し、コンプレント率 70%で 10%脳乳剤 10 マイクロを添加して感染させた。

(1) 短期間培養：各種細胞を 6cm シャーレ 5 枚に培養し、10%脳乳剤を添加後 24 時間後に脳乳剤を除き、培養液にて一度細胞を洗浄後、5 日間培養した。一日ごとにシャーレから細胞を回収し、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量や分解能をウエスタンブロット法にて解析した。

(2) 長期間培養：短期間培養と同様に 6cm シャーレ 24 枚に培養し、10%脳乳剤を添加後 24 時間後に添加脳乳剤を除き、培養液にて一度細胞を洗浄し最長で 28 日間培養した。2 日ごとに新鮮な培養液を 1ml 追加して組織培養を継続した。一方、2 日ごとに各シャーレー一枚から細胞を回収し、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量や分解能をウエスタンブロット法にて解析した。

## 3) ウエスタンブロット(WB)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。各種細胞の PrP<sup>C</sup> 量は、 $5 \times 10^5$  細胞にて発現している PrP<sup>C</sup> 量を WB 解析し定量化した。各種細胞内の PrP<sup>Sc</sup> 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。

## 4) 間接蛍光抗体法による PrP<sup>Sc</sup> の局在解析

各種培養細胞でのプリオンの取り込みは、細胞をスライドチャンバーに培養後、10%脳乳剤を 10 マイクロ加えて一夜培養し、添加脳乳剤を除いてからさらに一日培養した。各種培養細胞内に取り込まれた PrP<sup>Sc</sup> を 132 プリオン抗体で検出し Alexa488 にて発色後、蛍光顕微鏡下にて PrP<sup>Sc</sup> の局在を観察した。なお、細胞内の PrP<sup>C</sup> の発現をグアニジン塩酸塩にて処理し、132 プリオン抗体との反応性で解析した。

## 5) 20S プロテアゾーム活性

各種細胞の 20S プロテアゾーム活性は、20S Proteasome Assay Kit (Cayman Chemical Co., MI, USA) を用いて解析した。20S プロテアゾーム活性は、プリオン感染前の細胞と感染後の細胞につ

いて、その活性を測定した。

## 6) 混合培養による PrP<sup>Sc</sup> の伝達試験

感染細胞から PrP<sup>Sc</sup> の神経系細胞への伝播を解析する目的で、感染細胞をドナー細胞とし、PrP<sup>Sc</sup> を受け取る細胞をレシピエント細胞 (N2a-3/EGFP) として混合培養し、G418 を添加して、ドナー細胞を死滅させて、レシピエント細胞への PrP<sup>Sc</sup> の伝播を解析した。レシピエント細胞に関しては、4 日おきに 5 分の 1 ずつ継代することにより、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積性や分解性をウエスタンブロットにて確認した。

## (倫理面への配慮)

マウスへのスクレイपी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。

## C. 研究結果

### 1) 各種培養細胞での添加 PrP<sup>Sc</sup> の取り込み、増幅、分解

各種培養細胞に Chandler 感染 10%マウス脳乳剤を添加後、24 時間培養し上清を取り除いた後、各種細胞の PrP<sup>Sc</sup> の取り込み能と分解能を WB で解析した。特に、各種細胞の分解の経時的な変化を 5 日間観察した。その結果、免疫系 3 細胞 (J774,RAW,J558L) では培養 3 日目に培養細胞から PrP<sup>Sc</sup> が消失していることが明らかとなった(図 1)。免疫系細胞 P388-D1 と EL4 の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量は、観察した 5 日間では変化は見られなかった。一方 IL-1 細胞では、培養 3 日目と 5 日目で PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量が一過性に増加した。神経系細胞 (N2a-3 と GT1-7) では、時間がたつにつれて PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量が増加した。一方、RT4-D6P2T と TR6Bc1 細胞では取り込んだ PrP<sup>Sc</sup> 量が時間と共に減少していた。神経系の細胞である NB41A3 では、全般的に PrP<sup>Sc</sup> の取り込み量が少なかった。その他の細胞である IEC-18 と P1.HTR では、培養 3 日と 5 日で一過性の PrP<sup>Sc</sup> の増加が観察されて、その後減少した。NIH3T3 と HeLa 細胞では PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量が培養日数を経ることにより徐々に減少していることが明らかとなった。各細胞によりプリオン感染に対する細胞の反応は、細胞ごとに異なっていた(表 1)。

各種培養細胞での PrP<sup>Sc</sup> の取り込み能を間接蛍光抗体法を用いて PrP<sup>Sc</sup> の細胞内局在を解析した。その結果、ほとんどの細胞で、細胞内に局在した PrP<sup>Sc</sup> 粒子を確認した。今回解析した細胞の中で、WB で分解性が顕著な RT4-D6P2T 細胞では、細