

胞内での PrP^{Sc} の蓄積量が核周囲に局在していることが明らかとなった。一方、WB 解析で PrP^{Sc} の取り込みが悪かった NB41A3 や HeLa 細胞では、間接蛍光抗体法でも PrP^{Sc} の局在は少なかった。

2) 各種培養細胞での PrP^C の発現量の比較

各細胞の PrP^{Sc} の蓄積量に影響を与える PrP^C の発現量に関して解析した。その結果、一般的に神経系の 6 細胞は PrP^C の発現量が高いのに比べて、免疫系の 6 細胞では、PrP^C の発現は低かった。中でも、神経系の細胞の中で、NB41A3 の PrP^C 発現量は極めて低かった。一方、その他の細胞では、IEC-18 細胞は極めて高い PrP^C 発現量を示した。今回の研究で明らかとなった各種細胞の性状を表 1 にまとめた。

3) 各種培養細胞でのプロテアゾーム活性

各培養細胞が有するプロテアゾーム活性を測定する目的で、20S Proteasome Assay Kit を用いて解析した。その結果、免疫系細胞は、神経系細胞に比べて、プロテアゾーム活性が低いことが明らかとなった。腸管細胞由来の上皮系細胞 IEC-18 は、比較的高いプロテアゾーム活性を示した(図 2)。また、プリオン非感染と感染細胞でのプロテアゾーム活性を比較した場合、プリオン感染細胞では、一般的にプロテアゾーム活性が低下していることが明らかとなった。

4) 長期培養での感染 PrP^{Sc} の動態 (分解、増殖、伝播)

5 日間の短期間の培養条件ではなく、Chandler 株を感染後、長期にわたって培養細胞を維持した場合での細胞内での PrP^{Sc} の動態について解析した。感染後、長期にわたり培養細胞を維持する目的で、各シャーレに新鮮な培養液を少量ずつ添加して培養細胞を維持した。2 日おきに、シャーレに蓄積した PrP^{Sc} を WB にて解析した。その結果、解析に用いた 6 種類の培養細胞 (TR6Bc1, P1.HTR, IL-1, J588L, IEC-18, NIH-3T3) 全てで、感染させた PrP^{Sc} がいったん分解されて検出されなくなるが、15 日~28 日以降に細胞内の PrP^{Sc} が再度出現することが確認された。P1.HTR 細胞と IEC-18 細胞での長期培養の PrP^{Sc} の分解と再蓄積量の経時的な変化を図 3 に示した。細胞によっては、PrP^{Sc} が再蓄積して出現する日数は、異なっていた(図 3)。

5) 長期培養でのプリオン株の異同

長期培養で観察された、感染細胞での PrP^{Sc} の再出現が、用いた Chandler 株に特異的な反応であるかどうかを確認する目的で、Obihiro 株を用いて同

様の実験を 6 種類の培養細胞で解析した。その結果、一般的に、Obihiro 株を用いた方が、Chandler 株を用いた場合に比べて、細胞内の持続性が長く、細胞での PrP^{Sc} の分解がないまま PrP^{Sc} の蓄積が 3 細胞株 (P1.HTR, IL-1, J558L) で観察された。一方、他の 3 株 (TR6Bc1, IEC-18, NIH3T3) では、Chandler 株と同様に 3 日目位から PrP^{Sc} の蓄積量は減少し 7 日目位には WB で検出できないレベルまで減少した。その後、徐々に細胞内の PrP^{Sc} 量が増加し、培養 21 日目では PrP^{Sc} が WB で確実に検出された。

6) 細胞間でのプリオンの伝播

長期培養にて、蓄積した PrP^{Sc} の神経細胞 N2a-3/EGFP への伝播性を混合培養にて解析した。その結果、TR6Bc1 細胞では継代 8 回目に PrP^{Sc} のバンドが出現し、IEC-18 細胞では継代 12 回目にバンドが出現した。これにより長期培養にて検出された PrP^{Sc} は他細胞に感染性を有するプリオンであることが確認された(図 4)。

D. 考察

腸管組織を構成するを思われる培養細胞を用いて、プリオンの取り込み、分解、蓄積を WB で解析した。マウス由来の細胞を主に選別したこともあり、あらゆる種類の細胞を準備することができなかったが、免疫系細胞 6 種、神経系細胞 5 種、腸管由来の上皮系細胞 1 種、さらにその他の細胞として 3 種を本試験に用いた。その結果、細胞の種類により、プリオンの取り込みや分解が分類されるのではなく、細胞ごとにかなり異なった性状を示すことが明らかとなった。特に、神経系細胞でも、短期培養にて PrP^{Sc} の取り込み能の悪い細胞や分解能力の高い細胞もみられた。その一方で、免疫系細胞であっても、分解性よりは蓄積性の性質を示す細胞も観察された。WB で確認された PrP^{Sc} の取り込みは、間接蛍光抗体法にても確認され、細胞内での PrP^{Sc} の局在が明らかとなった。培養細胞の性質をより詳しく調べる目的で PrP^C の発現やプロテオゾーム活性を解析した。PrP^{Sc} の蓄積能が高い細胞では、PrP^C の発現が一般に高く蓄積能に影響しているように見られたが、細胞のプロテアゾーム活性は、PrP^{Sc} の蓄積性や分解性とは直接関係しやいように見受けられた。ただし、神経系細胞で分解能が旺盛な細胞である TR6Bc1 と RT4 ではプロテアゾーム活性が高かった。

短期培養だけではなく、プリオン感染後、長期にわたり培養細胞を維持することにより、感染後

の PrP^{Sc} の動態について解析した。全ての細胞で、感染後、長期培養することにより、PrP^{Sc} が再度蓄積してくることを WB で確認した。長期培養により出現した PrP^{Sc} のバンドは、感染初期に取り込んだ PrP^{Sc} ではなく、細胞が発現している PrP^C を PrP^{Sc} に変化されたものと考えられた。また、神経細胞との混合培養で、神経細胞へ PrP^{Sc} が伝達したことから、感染性を有する PrP^{Sc} が蓄積したものである。長期培養で PrP^{Sc} の蓄積した細胞で、4 日ごとに細胞を継代していくと、短期間の培養細胞では感染樹立細胞を樹立できなかった細胞でも、PrP^{Sc} を有する樹立細胞として樹立できた。このことは細胞内での PrP^{Sc} の増幅が極めて安定に維持されていることを示すものである。今回、長期の培養細胞で確認された PrP^{Sc} の再蓄積が、プリオン感染した腸管の組織で実際に起きているかどうかは不明であるが、プリオン病発症までの潜伏期の長さを考えた場合、極めて示唆に富む結果と言える。

E. 結論

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^{Sc} 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^{Sc} 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。長期間にわたる培養細胞のプリオンに対する反応性は、プリオン感染した生体での発症に至る潜伏期間の長さを考え

る上で示唆に富む知見と言える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamao, H., Inoshima, Y. and Ishiguro, N. Distribution of immune cells and expression of interleukin receptors in ileal Peyer's patches of calves. *Cell Tissue Res.*, 346:245-254, 2011
- 2) Murakami, M., Inoshima, Y., Watanabe, K., Kobayashi, Y., Matsui, T., Kurazono, H. and Ishiguro, N. Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid.*, 18:112-118, 2011

2. 学会発表

- 1) 田中佑布子、猪島康雄、石黒直隆：培養細胞でのプリオンの伝達。第 152 回日本獣医学会学術集会（大阪）2011 年 9 月。
- 2) Elhelaly Abdelazim, 猪島康雄、石黒直隆：Response to prion agent in different cell lines 第 152 回日本獣医学会学術集会（大阪）2011 年 9 月

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. 各種細胞の性状と感染 PrP^{Sc} との反応性 (短期培養結果を基に作成)

性状	免疫系細胞						神経系細胞					腸管細胞	その他		
	J774	RAW	P338-D1	IL-1	J588L	EL-4	N2a-3	NB41A3	RT4	TR6 Bc1	GT1-7	IEC-18	NIH3T3	P1HTR	HeLa
PrP ^c 発現	+	±	+	+	+	+	+++	±	++	+++	++	++++	++	±	±
PrP ^{Sc} の取り込み (WB)	++	+++	++	++	+	+	++	±	+++	++	+	++	+	±	±
PrP ^{Sc} の取り込み (IFA)	++	+++	++	++	+	+++	+	±	++++	+++	++	++	++	++	+
PrP ^{Sc} 保持	±	±	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
PrP ^{Sc} の蓄積	-	-	-	±	-	-	+++	-	-	-	++	±	-	-	-
感染細胞の樹立	-	-	-	-	-	-	++ (P3)	-	-	-	+ (P6)	-	-	-	-

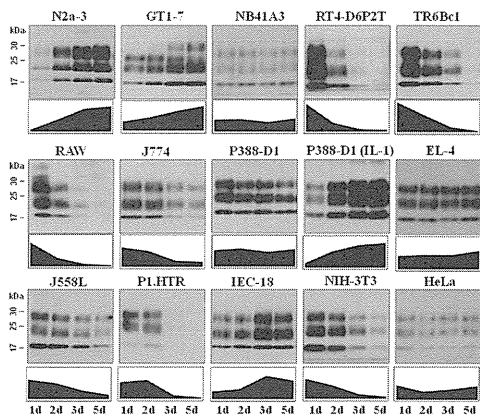


図 1. 各種細胞での PrP^{Sc} の取り込みと分解

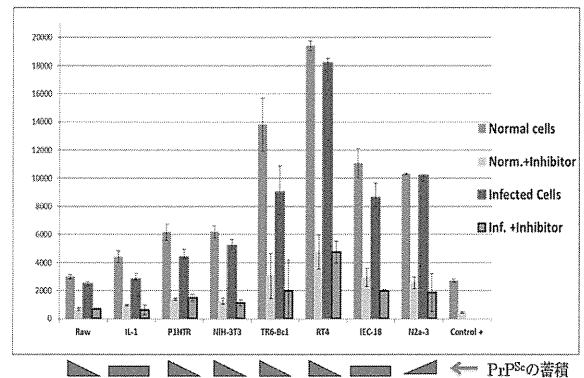


図 2. 各種細胞のプロテアゾーム活性

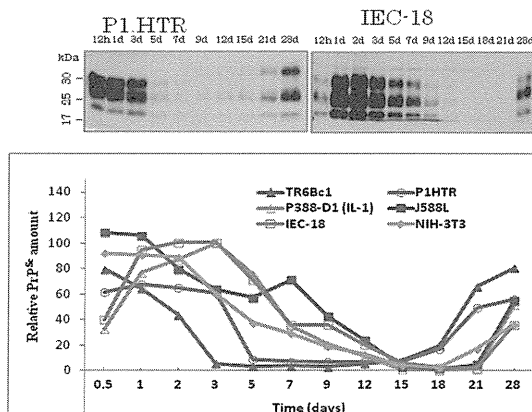


図 3. 長期培養での感染 PrP^{Sc} の動態

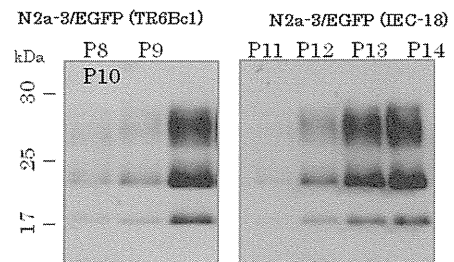


図 4. 感染細胞から N2a-3/EGFP への PrP^{Sc} の伝播

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

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

研究協力者 祖母井 香織（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）

西田 教行（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）

研究要旨

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我々は、すでに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。今年度の研究により牛配列のリコンビナントプリオンタンパク（rBoPrP）を 37℃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異常型プリオンタンパクを検出することが可能となった。今後はこの方法の信頼性を高めるとともに、今回見られた現象のより根本的なメカニズムの理解を目指すことが必要であると考えます。

A. 研究目的

① 我々が以前開発した異常型プリオンタンパク（PrP）試験管内増幅法（real-time QUIC法）を用いて、BSE感染動物由来の組織・体液に含まれる、通常では検出できない微量の異常型PrPを増幅し検出する高感度検査法を確立する。またreal-time QUIC法とend-point dilutionによる異常型PrPの定量法（シード量の測定）を確立することも目指す。

② BSEは他のプリオン株に比べ異種へ伝達しやすく、また株の特徴（病理像等）がほとんど変化しないことが示されているが、その理由・分子機構については解明されていない。したがって本研究では異常型PrP試験管内増幅法を中心としたin vitroレベルの解析を行うことにより、上記に挙げたようなBSE株の特異的な性質をもたらす分子機構の解明を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP (rPrP) の精製

ウシ PrP 配列の発現ベクターを作製後、大腸菌に transformation し、発現誘導する。PrP の N 末側には銅結合領域があり、ヒスチジンタグがなくても金属キレートアフィニティークロマトグラ

フィーにより精製可能である。大腸菌に rPrP を発現させると封入体を形成するため、6M のグアニジン塩酸で溶解した後、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) を用いて一晩かけてグアニジン塩酸濃度を 6M から 0M まで徐々に勾配させて rPrP を refold させた後、イミダゾールにより溶出する。イミダゾールは透析により除去する。精製した rPrP は小分けして急速凍結し-80℃で保存する。

2) BSE に対する QUIC 反応の最適化

real-time QUIC 法の最適化を図るため、リコンビナント PrP (rPrP) の種類や反応溶液の条件を変え、最も感度・特異度の高くなる条件を見出すまで検討を行う。最適条件検討の際には、反応のシードとして BSE 感染牛脳乳剤を用い、negative control として非感染牛脳乳剤を用いる。最適条件決定の後には BSE 感染牛由来の髄液中の PrP^{Sc} の検出を試みる。

（倫理面への配慮）

BSE 感染牛脳乳剤は、国立感染症研究所感染病理部より、髄液は北海道立畜産試験場基盤研究部より共同研究として提供される。それらは牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し、許可を得たものである。

C. 研究結果

1) rBoPrP の保温による real-time QUIC 法への効果

これまでの検討で BSE 感染牛由来の脳乳剤をシードとした rBoPrP の real-time QUIC 法では 1×10^{-6} 希釈までが検出限界であった。そこで rBoPrP がより凝集反応を起こすやすくするため、37°C で 1 週間程度保温した後、QUIC 反応を行なってみたところ、 1×10^{-8} 希釈まで増幅反応が見られた (図 1)。この現象は再現性があることも確認した。

2) BSE 感染牛由来の髄液を用いた検討

北海道立畜産試験場基盤研究部より提供を受けた 4 頭の BSE 感染牛由来の髄液と陰性コントロールとして 1 頭の正常牛由来の髄液を用いて、1) で行なって条件 (37°C で 1 週間保温) で rBoPrP の real-time QUIC 法を行なった。その結果、シードなしでの反応や正常牛由来の髄液では ThT の蛍光値の上昇は全く見られなかったのに対して、BSE 感染牛由来の髄液では 4 例中 3 例で陽性となった (表 1)。

D. 考察

これらの結果から Soluble form の rPrP の folding の状態が RT-QUIC の感度に影響を及ぼしていることが推測される。ただし保温することが rPrP に実際どのような影響を与えているかについての解析は十分でなく今後の課題である。また保温すること以外に QUIC 反応の感度を上昇される条件がないかなどについても検証する。

rBoPrP の real-time QUIC 法の BSE に対する検出感度は異常型 PrP に換算すれば CJD に対する rHuPrP の real-time QUIC 法の感度にほぼ匹敵する。今後は上記でのべた課題も含め、さらにこの方法の信頼性を高めると共に、調べる BSE 検体を増やして検討を重ねる必要があると考えている。

E. 結論

BSE に対する rBoPrP の real-time QUIC 法は rBoPrP を 37°C で 1 週間程度保温すると、検出感度が希釈系列で 2 桁上昇することが判明した。さらにこの改良により、BSE 感染牛由来の髄液中のプリオンを検出可能となった。今後はこの現象のメカニズムの解明も含め、さらなる検証を行うと

ともにより、実用的なアッセイを確立したいと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Sano K, Satoh K, Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: A highly sensitive assay for prion detection. *Prion.*, 5(3), 2011
- 2) Matsui Y, Satoh K, Miyazaki T, Shirabe S, Atarashi R, Mutsukura K, Satoh A, Kataoka Y, Nishida N. High sensitivity of an ELISA kit for detection of the gamma-isoform of 14-3-3 proteins: usefulness in laboratory diagnosis of human prion disease. *BMC Neurol.*, 11:120, 2011
- 3) Fujita K, Harada M, Sasaki M, et al. Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open* 2:e000649, 2012

2. 学会発表

- 1) Atarashi, R., Satoh, K., Kazunori Sano, K., Fuse, T., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., and Nishida, N. Evaluation of RT-QUIC (real-time quaking-induced conversion) assay for genetic human prion diseases. Prion2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 2) Atarashi, R. Specificity of Human Prion Detection in CSF. CJD 2011 and the Ninth Annual CJD Foundation Family Conference (July, 8-10, 2011, Washington DC, USA)

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

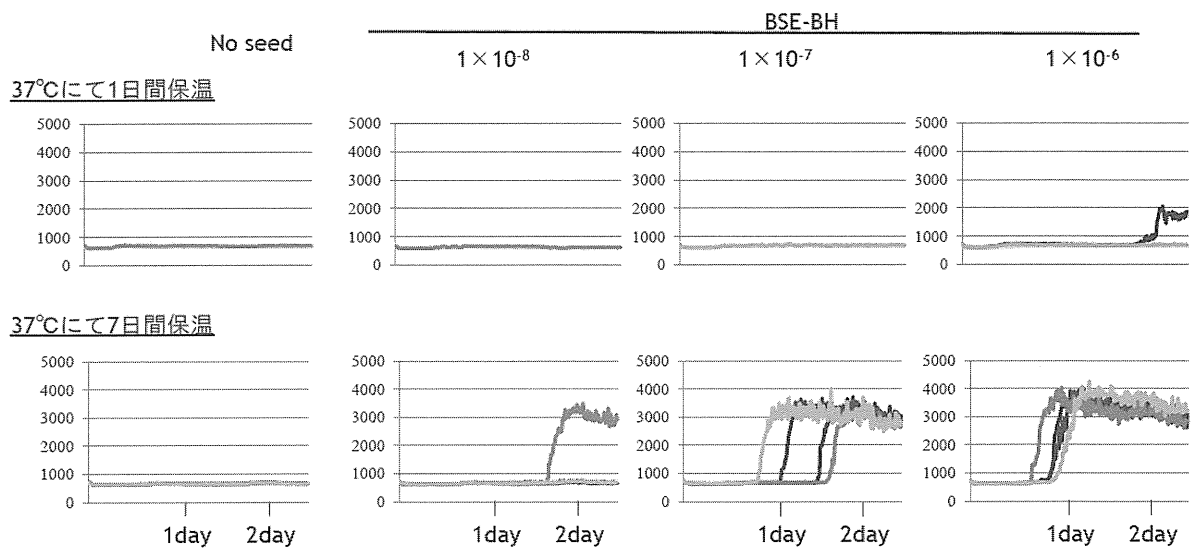


図 1

	接種日	BSE接種	解剖日 (接種後の日数)	臨床症状	WB	QUIC
No.4000	生後84日	+	523日	+	+	 (+)
No.4017	生後80日	-	523日	-	-	 (-)
No.1912	生後75日	+	484日	-	+	 (+)
No.6627	生後107日	+	484日	-	+	 (+)
No.9007	生後104日	+	530日	-	+	 (-)

表 1

4. 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

分担研究者 北本 哲之 東北大学大学院 医学系研究科 教授

研究要旨

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 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。さらに、トランスジェニックマウスを用いた過剰発現系では、129V/V の遺伝子型でも vCJD プリオンに対して完全な抵抗性とはならないことが明らかとなった。そこで、昨年度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が、その方法が他のヒト・プリオン病との区別に使えることを今年度は多数の症例を用いて確認した。

A. 研究目的

我が国のヒトのプリオン蛋白多型性には、以下のような遺伝子型が存在する。コドン 129 に関しては、129M/M, 129M/V, 129V/V という遺伝子型があり、コドン 219 に関しては、219E/E, 219E/K, 219K/K がある。この遺伝子型のプリオン蛋白が vCJD プリオン感染に対して感受性をもつのかは、vCJD プリオンの輸血などの 2 次感染を考える上で必要な情報である。例えば、我々は日本人に特徴的な codon 219Glu/Lys の遺伝子型が、sCJD を発病することはないものの、vCJD 感染には高い感受性を持つことを報告してきた。2010 年 Arch. Neurol. 誌で、英国の vCJD に 2 例 codon 219Glu/Lys をもつ症例が発病したことの報告があった。英国ではこの遺伝子型はほとんど存在しない遺伝子型であるので、日本人は vCJD に感染しやすいことがノックインマウスの結果通りとなったわけである。

このように、直接ヒト型のプリオン蛋白遺伝子の多型性を導入したノックインマウスを作製して、vCJD プリオンに対する感受性を検討するのが本研究の主な目的である。

B. 研究方法

【材料】感染因子として、vCJD や sCJD だけでなく、硬膜移植後の CJD も用いた。また、発病したノックインマウスの感染脳も感染因子として用いた。使用した実験動物モデルは、基本的にヒト型プリオン蛋白のノックインマウスとウシ型プリオン蛋白のノックインマウスであるが、今回は特別に過剰発現系での感受性を検

討する意味で、ノックインマウスとトランスジェニックマウス (Tg+Ki で TK-129V と略す) を交配した 129Val 型の過剰発現モデルも用いた。

【方法】感染は腹腔内に 10% 脳乳剤を 50 μ l 投与後、75 日経過を観察した。マウスの脾臓の半分を免疫染色検査 (Kitamoto et al, 1991) に、残りの半分を Western blot 検査 (Asano et al, 2006) に利用した。頭蓋内投与の感染実験では、10% 脳乳剤を 20 μ l 投与後発病まで観察し、マウスの脳半球を組織学的検索に、残りの半球を凍結し Western や感染実験に用いた。

C. 研究結果

過剰発現系と vCJD 感染の成功率

接種材料	モデル動物	感染成立/全頭
vCJ96/02	Ki-129V/V	0/4
	TK-129V	3/7
vCJ05/02	Ki-129V/V	5/8
	TK-129V	6/7

約 2 倍程度の発現量の違いであるが、PrPres 量の少ない 96/02 であっても過剰発現系では感染が成立することが明らかとなった。

ヒト・プリオンの Ki-Bov への感染

昨年度より、接種するヒト・プリオン数・種類を増やしてウシ型ノックインマウスへの感染実験が vCJD プリオン由来と考えて良いのかをさらに検証した。検証した実験結果は以下のようにまとまる。

接種材料	脾臓陽性率	陽性 FDC/Follicles
Hu129V/V[vCJD]	5/5	33/481 (6.86%)
sCJD VV2	0/4	0/424

sCJD VV2	0/5	0/484
Hu129MV[vCJD]	6/6	129/741 (17.41%)
sCJD MV2	0/5	0/471
sCJD MV1	0/5	0/416
Hu129MM[vCJD]	6/6	209/738 (28.32%)
sCJD MM1	0/5	0/605
sCJD MM2T	0/4	0/448
sCJD MM2T	0/4	0/409
dCJD MM1	0/3	0/296
dCJD MM1	0/4	0/293
dCJD MMi	0/5	0/499
dCJD MMi	0/5	0/338
dCJD MMi	0/6	0/618
vCJD96/02	6/6	54/545 (9.9%)
vCJD05/02	4/4	99/294 (33.7%)

上の表で、Hu129V/V[vCJD]は、ヒト型ノックインマウスの遺伝子型[接種材料]を示している。よって、Hu129MV[vCJD]は、vCJDを接種したヒト129MVのノックインマウスの脳を接種材料としたという意味である。

組織学的には、vCJDの感染が成立したマウスからの感染のみ、FDCが陽性に染色された。sCJDでは、MV1, MV2, VV2のいずれの症例でもウシ型ノックインマウスに感染は認められなかった。

ウエスタンブロットでも、免疫組織学的検索と同様の結果が得られた。vCJDに感染したマウスの脳からの感染実験のみ、異常プリオン蛋白の沈着を認めた。

D. 考察

一昨年度の報告でコドン129V/VのヒトがvCJDになる可能性が高いことを見出したが、問題はコドン129V/VのヒトがsCJDを発病するとタイプ2の異常型プリオン蛋白をもち、アミロイド斑が多数みられるのでsCJDなのかvCJDなのかを正確に鑑別できる方法の開発が急務であるというのが去年の報告であった。ほとんどのVV2の症例と、vCJDを発病した129V/Vの症例では、アミロイド斑、タイプ2ともに陽性の可能性が高く、sCJDとvCJDが容易には区別不可能であるからである。

我々は、以前からtrace back現象を報告しており、これはBSE由来のvCJDプリオンのみがウシ型ノックインマウスに感染するまたは感染しやすいという現象である。vCJDプリオンをウシ型ノックインマウスの腹腔内に投与したところ、vCJDのみが脾臓での異常プリオン蛋白の沈着を引き起こし、他のCJDでは全く感染が成立しなかったから、プリオン感染に

はトレーサビリティーが存在することを報告したわけであるが、この現象が129Val/ValのvCJDプリオンでも存在するのか検討したところ、予想通りトレーサビリティーが認められた。トレースバック現象は、129Met/Valの症例でも認められ、広く全ての遺伝子型で応用できる可能性が示唆された。また、昨年度のsCJDに加えて、今年度は129M/Mの遺伝子型をもつsCJDやdCJDではウシ型ノックインマウスに感染を引き起こすことができず、vCJDプリオンかvCJDプリオンに感染したマウスのみウシ型ノックインマウスに感染を引き起こせることを証明した。

E. 結論

プリオンの脳内投与ではコドン129V/Vのヒト型ノックインマウスでも高率に感染することが明らかとなった。129V/VのヒトでもvCJDなのかsCJDなのかを鑑別する方法を確立した。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Kobayashi, A., Mizukoshi, K., Iwasaki, Y., Miyata, H., Yoshida, Y., Kitamoto, T. Co-occurrence of types 1 and 2 PrPres in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1. *Am. J. Pathol.*, 178: 1309-1315, 2011
 - Takeuchi, A., Komiya, M., Kitamoto, T., Morita, M. Deduction of the evaluation limit and termination timing of multi-round protein misfolding cyclic amplification from a titration curve. *Microbiol. Immunol.*, 55(7): 502-509, 2011
 - Iwasaki, Y., Mori, K., Ito, M., Nagaoka, M., Ieda, T., Kitamoto, T., Yoshida, M., Hashizume, Y. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type. *Neuropathology*, 31(5): 540-548, 2011
 - Yokoyama, T., Takeuchi, A., Yamamoto, M., Kitamoto, T., Ironside, JW., Morita, M. Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* 498(2): 119-123, 2011

5) Nishimoto, Y., Ito, D., Suzuki, S., Shimizu, T., Kitamoto, T., Suzuki, N. Slow-progressive ataxia with a methionine-to-arginine point mutation in codon 232 in the prion protein gene (PRNP). Clin. Neurol. Neurosurg., 113(8): 696-698, 2011

6) Kono, S., Manabe, Y., Fujii, D., Sakai, Y., Narai, H., Omori, N., Kitamoto, T., Abe, K. Serial diffusion-weighted MRI and SPECT findings in a Creutzfeldt-Jakob disease patient with V180I mutation. J. Neurol. Sci., 301(1-2): 100-103, 2011

7) Takeda, N., Yokota, O., Terada, S., Haraguchi, T., Nobukuni, K., Mizuki, R., Honda, H., Yoshida, H., Kishimoto, Y., Oshima, E., Ishizu, H., Satoh, K., Kitamoto, T., Ihara, Y., Uchitomi, Y. Creutzfeldt-Jakob disease with the M232R mutation in the prion protein gene in two cases showing different disease courses: A clinicopathological study. J. Neurol. Sci., in press

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし
2. 実用新案登録
なし

5. プリオン感染による、細胞脆弱性の分子機序解明

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

研究協力者 村松 直美 (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)

研究要旨

プリオン病における神経細胞死の分子メカニズムは不明である。また、プリオン感染による細胞死のメカニズムを解析するための、良い *in vitro* システムが存在しない。我々は独自に確立した 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)や抗プリオン抗体で治療した細胞(cured N2aC24L1-3)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。また我々は、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。しかし、他のプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンでは、このような違いは認められなかった。これらの結果は、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た。

A. 研究目的

プリオンによる細胞死の分子メカニズムを解析する良い *in vitro* システムが存在しない。本研究において、我々は独自に確立した 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)や抗プリオン抗体で治療した細胞(cured N2aC24L1-3)より有意に細胞死を起こす事を見出した。そこで我々は、プリオンの細胞毒性の解明を目標とし、N2aC24L1-3 の MG132 に対する細胞脆弱性の分子メカニズムを解明することにした。

B. 研究方法

1) 細胞

本研究では、我々が独自に確立した 22L プリオン感染マウス神経芽細胞(N2aC24L1-3)、非感染細胞(N2aC24)、及び SAF32 抗プリオン抗体で治療した細胞(cured N2aC24L1-3)を用いた。

2) 細胞死の解析

細胞培養液中にそれぞれの薬剤を添加し、それぞれの時間で細胞数をカウントした。

3) 細胞周期の解析

常法に従い、よう化プロピジウム(PI)を用いた

FACS により解析した。

4) M 期細胞の計測

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)で染色し、M 期特有の染色体像を示す細胞を計測した。または、M 期特有のリン酸化ヒストン 3(pH3)の染色像を基に計測した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験や動物実験については、徳島大学の遺伝子組み換え安全委員会や動物実験委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1) プリオン感染細胞は MG132 に脆弱である

非感染細胞(N2aC24)、22L プリオン感染細胞(N2aC24L1-3)、及び治療細胞(cured N2aC24L1-3)の培養液中に、様々な濃度のプロテアソーム阻害剤 MG132 を添加し、24 時間後に生細胞数を計測した。すべての細胞が、MG132 の濃度依存的に細胞死を起こしたが、N2aC24L1-3 は他の細胞と比べて有意に細胞死を起こした (図 1)。しかし、他のプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンでは、有意な細胞死を誘導しなかった(data not shown)。

2) MG132 によるプリオン感染細胞の脆弱性はカスパーゼを介したアポトーシスによる

MG132 によるプリオン感染細胞の脆弱性にカスパーゼを介したアポトーシスが関与するのか解析した。まず、MG132 添加後のカスパーゼ 3 の活性をそれぞれの細胞において調べた。その結果、12 時間後には有意なカスパーゼ 3 の活性の上昇は認められなかったが(data not shown)、24 時間後には N2aC24L1-3 において有意なカスパーゼ 3 の活性上昇が観察された (図 2)。また、MG132 による N2aC24L1-3 の細胞死がカスパーゼ 3 阻害剤により濃度依存的に抑制された(data not shown)。

3) MG132 処理により、プリオン感染細胞は G2 期で停止する

MG132 によるプリオン感染細胞の脆弱性のメカニズムをさらに明らかにするために、MG132 処理 12 時間後のそれぞれの細胞の細胞周期について解析した。PI を用いた FACS 解析では、MG132 処理がないと、いずれの細胞も G1 期有意の細胞周期像を示した(data not shown)。また、MG132 処理すると、いずれの細胞も G2/M 期有意の細胞周期像を呈した(data not shown)。さらに我々は、DAPI 染色や pH3 の染色像を基に、N2aC24L1-3 と N2aC24 の M 期の細胞数を計測した。その結果、MG132 無処理ではいずれの細胞群でも M 期細胞の割合は約 8-10% で有意な差は認められなかった (図 3)。しかし、MG132 処理した N2aC24L1-3 では、コントロールの N2aC24 と比べて、有意に M 期の細胞が多く存在した (図 3)。

D. 考察

我々は、22L プリオン感染細胞 N2aC24L1-3 がコントロールの非感染細胞 N2aC24 に比べて、MG132 に脆弱で有意に細胞死を起こす事を見出した。この脆弱性は、N2aC24L1-3 を抗プリオン抗体にて治療する事により改善する。これらの結果は、MG132 による N2aC24L1-3 の脆弱性がプリオン感染によってもたらされた事を示している。また我々は、N2aC24L1-3 を MG132 処理する事によるカスパーゼ 3 の活性が上昇する事、及びカスパーゼ 3 阻害剤によって MG132 による N2aC24L1-3 の細胞死が阻害される事を示した。従って、MG132 による N2aC24L1-3 の脆弱性はカスパーゼの活性を介したアポトーシスの上昇による事が考えられた。

MG132 を添加すると、通常、細胞は M 期で細胞周期を停止する。しかし我々は、N2aC24L1-3 は M 期まで進行せず、手前の G2 期で細胞周期を停止する事を見出した。コントロールの N2aC24 は M 期で停止していた。以上の結果は、MG132 による N2aC24L1-3 の脆弱性は、細胞周期障害を介している可能性を示した。

興味深いことに、他のプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンでは、このような違いは認められなかった。従って、N2aC24L1-3 の脆弱性は MG132 特異的な現象と考えられる。

E. 結論

プリオンの細胞毒性は MG132 により表面化し、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が考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishibashi, D., Yamanaka, H., Mori, T., Yamaguchi, N., Yamaguchi, Y., Nishida, N. and Sakaguchi, S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine*, 29(50): 9321-9328, 2011
- 2) Fujita, K., Yamaguchi, Y., Mori, T., Muramatsu, N., Miyamoto, T., Yano, M., Miyata, H., Ootsuyama, A., Sawada, M., Matsuda, H., Kaji, R., and Sakaguchi, S. Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. *Cell Mol Neurobiol.*, 31: 999-1008, 2011

2. 学会発表

- 1) 内山圭司、坂口 末廣. プリオン感染細胞における細胞内小胞輸送の抑制. 第 26 回中国四国ウイルス研究会. 徳島大学青藍会館 (徳島) 6/18-19, 2011
- 2) 坂口 末廣、宮田 博規、山口 仁孝、村松 直美、森 剛志、内山 圭司、犬伏 祥子. 異なるプリオン株の産生メカニズムについて.

- 第 26 回中国四国ウイルス研究会. 徳島大学
青藍会館 (徳島) 6/18-19, 2011
- 3) Ishibashi, D., Yamanaka, H., Yamaguchi, N.,
Yamaguchi, Y., Nishida N. and Sakaguchi, S.
細菌由来の蛋白 succinylarginine dihydrolase
の免疫によるプリオン病の予防効果
Immunization with bacterial enzyme
succinylarginine dihydrolase induces antigenic
mimicry-mediated anti-prion effects in mice). 第
40 回日本免疫学会抄録. 幕張メッセ (千葉
市) 11/27-29, 2011
- 4) Sakaguchi, S. The role of the N-terminal region
of prion protein in prion disease. 8th IBRO
World Congress of Neuroscience (July 14-18,
2011, Florence, Italy)
- 5) 坂口末廣. プリオン病の基礎研究: プリオン
蛋白の病態機序. 第 11 回徳島神経難病セミ
ナー. 徳島県立障害者交流プラザ. 1/22, 2012

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。

図 1 : プリオン感染細胞は MG132 に脆弱である。

N2aC24、N2aC24L1-3、cured N2aC24L1-3 の培養液中に、プロテアソーム阻害剤 MG132 を添加し、24 時間後に生細胞数を計測した。すべての細胞群が、MG132 の濃度依存的に細胞死を起こしたが、N2aC24L1-3 は他の細胞と比べて有意に細胞死を起こした。

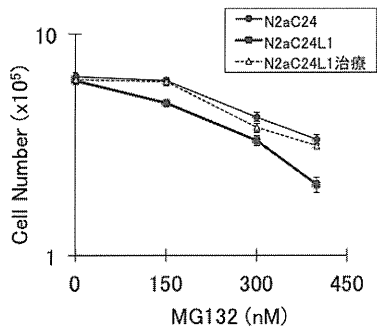


図 2 : MG132 によるプリオン感染細胞の脆弱性はカスパーゼを介したアポトーシスによる。MG132 添加 24 時間後の、N2aC24(N2a と図中表示)、N2aC24L1-3(L1 と図中表示)、cured N2aC24L1-3(L1cure と図中表示)のカスパーゼ 3 活性を調べた。その結果、N2aC24L1-3 において有意なカスパーゼ 3 の活性上昇が観察された。

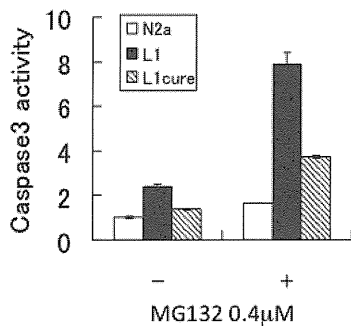
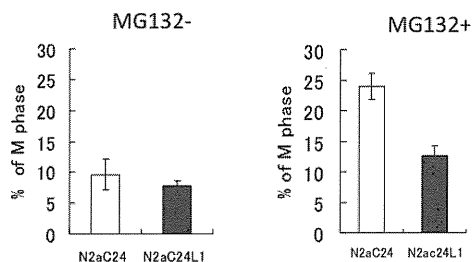


図 3 : MG132 処理により、プリオン感染細胞は G2 期で停止する。

DAPI 染色や pH3 の染色像を基に、N2aC24L1-3 と N2aC24 の M 期の細胞数を計測した。MG132 無処理ではいずれの細胞群でも M 期細胞の割合は約 8-10% で有意な差は認められなかった。しかし、MG132 処理 12 時間後の N2aC24L1-3 では、コントロールの N2aC24 と比べて、有意に M 期の細胞が多く存在した。



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

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)

萩原 健一 (国立感染症研究所・細胞化学部)

山河 芳夫 (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)

飛梅 実 (国立感染症研究所・感染病理部)

佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所)

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 (非定形 BSE JP/24 佐世保) の接種を行い、継時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、それぞれ、vCJD、孤発性 CJD (sCJD) に類似した特徴が認められたことから、継代を進め、発症モデル系として確立することにより、プリオン病の発症機序解明、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であると考えられた。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。

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 21 頭を用いて、BSE 感染牛 (BSE JP/8 和歌山: C-BSE) 脳乳剤および、非定形 BSE 感染牛 (BSE JP/24 佐世保: L-BSE) 脳乳剤を用いて接種実験と病態解析を進めている。接種後、発症までに定期的臨床症状、運動機能、高次脳機能、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 21 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馴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°C、相対湿度 50-60%、12 時間証明 (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。

2) 実験群および接種材料

実験群について下記に記載する (表 1)。

第 1 群: C-BSE 初代接種初期検索群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10% 脳乳剤を接種した。

経口接種 (脳乳剤 2ml) 2 頭 (#1, 2)

腹腔内接種 (脳乳剤 2ml) 2 頭 (#3, 4)

各群 1 頭ずつ各々接種後 3 か月、6 か月目に安楽死を行い異常プリオン蛋白の初期対内分布について検索を行った。

第2群：C-BSE 初代接種群

カニクイザル6頭を下記の2群に分け、BSE(BSE JP/8 和歌山)感染ウシの10%脳乳剤を、それぞれの経路で接種した。

経口接種(脳乳剤2mlx3回)3頭(#5, 6, 9)

脳内接種(脳乳剤0.2ml)3頭(#7, 10, 11)

脳内接種群3頭は発症後、経口投与群3頭中1頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。

第3群：C-BSE 第2継代接種群

カニクイザル4頭を下記の2群に分け、第2群で発症したカニクイザル(#7)の材料を用いて、それぞれの経路で接種した。

静脈内接種(血液40ml)2頭(#12, 13)

脳内接種(脳乳剤0.2ml)2頭(#16, 17)

脳内接種群2頭は発症後、静脈内投与群2頭中1頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。

第4群：C-BSE 第3継代接種群

カニクイザル2頭に第3群で発症したカニクイザル(#17)10%脳乳剤を、脳内接種する。

脳内接種(脳乳剤0.2ml)2頭(#20, 21)

高次脳機能検査(食物回収試験)データおよび、睡眠脳波データ蓄積後接種を行う予定である。

第5群：L-BSE 初代接種群

カニクイザル4頭を下記の2群に分け、BSE(BSE JP/8 和歌山)感染ウシの10%脳乳剤の脳内接種および20%脳乳剤の経口投与をおこなった。

脳内接種(脳乳剤0.2ml)2頭(#14, 15)

経口接種(脳乳剤5mlx8回)2頭(#18, 19)

脳内接種群2頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

第6群：L-BSE 第2継代接種群

カニクイザル2頭に第5群で発症したカニクイザル(#15)10%脳乳剤を、脳内接種する。

脳内接種(脳乳剤0.2ml)2頭(#22, 23)

高次脳機能検査(食物回収試験)データおよび、睡眠脳波データ蓄積後接種を行う予定である。

表1 接種群

接種群	接種材料	接種日	接種ルート	通番	接種年齢	潜伏期	接種後解剖年
第1群	C-BSE牛脳乳剤	2003/4/14	経口	#001	1.7		0.2
				#002	1.7		0.5
			腹腔内	#003	1.6		0.2
				#004	2.0		0.5
第2群	C-BSE牛脳乳剤	2003/8/6	経口	#005	2.3		
				#006	2.2		7.4
		2003/9/13		#009	2.4		
		2003/8/6	脳内	#007	2.0	2.3	3.1
				#010	2.3	2.3	2.9
		2003/9/13		#011	2.4	3.7	4.8
第3群	C-BSE発症サル(#7)血液	2006/9/12	静脈内	#012	1.4		
				#013	1.7		4.8
	C-BSE発症サル(#7)脳乳剤	2007/9/12	脳内	#016	2.1	1.5	2.6
第4群	C-BSE発症サル(#17)脳乳剤		脳内	#017	2.0	1.1	1.6
				#20			
				#21			
第5群	L-BSE牛脳乳剤	2007/9/12	脳内	#014	2.1	1.7	2.1
				#015	2.0	1.6	2.0
		2011/8/31	経口	#18	1.3		
				#19	1.3		
第6群	L-BSE発症サル(#15)脳乳剤		脳内	#22			
				#23			

3) 接種および材料採取方法

経口接種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、前述の投与量にて実施した。

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、ACD液で採取した血液を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。

接種後、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た。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。

安楽死は塩酸ケタミン筋肉内投与による麻酔後、ペントバルビタール静脈内投与による深麻酔下において放血後過剰量のペントバルビタールを投与により行った。

4) 解析方法

1. 行動観察

行動観察・ビデオ撮影

アップルテスト (運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

2. 高次脳機能解析

1: 指迷路試験

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便におこなう装置であり、4 段の指迷路装置内に置かれた報酬を移動させ、最終的に取りだし口から獲得する方法を学習させたうえで、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテスト (24 試行) の成功率を長期記憶の評価とした。また、指迷路試行中にみられる折り返し行動、停止行動に着目し、思考経過についての検討を行った。本評価系は#5~#11 に実施した。

2: 食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルは報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行う。本評価系は#18~#23 で実施することとした。

3. 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。

4. 蛋白解析

経口投与初期の糞便及び、安楽死を行った2頭について、血液、脳脊髄液及び全臓器についてプロテアーゼ抵抗性を獲得した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) について、ウエスタンブロット (WB) 法により検索を行った。WBは細切組織を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mAb 3F4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. 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135°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。また、GFAP 染色によりグリア増生レベルについて解析を行った。

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、ボリウム解析プログラム 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収容した。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) 臨床経過

BSE 感染実験に用いたカニクイザルの一覧を表 1 に示す。C-BSE 牛脳乳剤、サル継代脳乳剤および、L-BSE の脳内接種を行った全 7 頭はいずれも 4 年以内に発症し、安楽死を行った。C-BSE 感染牛脳乳剤脳内接種群の発症までの潜伏期間は 29 ~ 44 ヶ月と個体差が認められたが、発症カニクイザル脳乳剤を脳内接種した 2 頭では、潜伏期間は短縮した。発症後の臨床症状は 5 頭ともほぼ同様な経過が観察された。すなわち、初期症状は食欲不振、驚愕反応等行動異常が観察され、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。経口投与を行った 3 頭は投与 8 年を経過し、異常行動、神経症状は観察されていない。1 頭において、7 年 4 ヶ月目に安楽死を実施した。発症カニクイザル #007 の血液を輸血した 2 頭は輸血後 5 年目までに、異常行動、神経症状は観察されていない。1 頭において 4 年 10 ヶ月目に安楽死を実施した。

表 2 臨床所見

接種材料	C-BSE					L-BSE	
	牛脳乳剤			サル脳乳剤		牛脳乳剤	
サル継代	#7	#10	#11	#16	#17	#14	#15
動物番号	#7	#10	#11	#16	#17	#14	#15
潜伏期(月)	29	27	44	15	13	19	19
接種後解剖時(月)	37	35	59	20	19	25	24
異常行動							
沈鬱	-	+++	-	+	-	-	-
自傷行動	+	-	+	-	-	-	-
食欲不振	+	-	+	-	+	-	+
欠伸	-	+	-	-	-	-	-
驚愕反応	+++	+++	++	++	++	-	-
神経書状							
小脳性麻痺	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
振戦	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
ミオクローヌス	++	++	++	-	++	+++	+++
四肢麻痺	+++	++	+++	+	++	+++	+++
起立不能	+++	++	+++	-	+	+++	+++

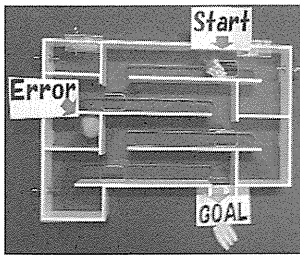
L-BSE 感染牛脳乳剤を脳内接種した 2 頭では、接種後 19 ヶ月で神経症状が認められ約 4 カ月後に安楽死を行った。症状は加速歩行、立毛、前傾で膝が内反した姿勢をとり、後肢指先の持続的な不随意運動、四肢の顕著なミオクローヌス、企画震戦、運動失調が認められ、麻痺は進行し、起立困難となった。明らかな驚愕反応は認められなかった。末期では無表情となり、観察者の接触に対する反応性が低下した。

2) 高次脳機能解析

指迷路試験は C-BSE を接種した第 2 群の 6 頭について実施した。脳内接種後神経症状が 3 頭について症状発現初期では正答率の低下は認められなかったが、症状の進行とともに急激な低下が認められた。また、成功率にかかわらず、異常行動が認められる時期よりリンゴを左右に折り返して成功のルートに悩む動作や試行中に装置から手を放す停止行動が頻繁に観察されるようになった。経口投与を行った 3 頭中 # 6 では接種後 7.4 年目の解剖前にはモチベーションの維持が低下している傾向が認められた。また # 9 でこれまで 90%以上の正答率を維持していたが、近年約 80%の正答率の低下傾向が認められた。

第 4 群、6 群ではトレーニング期間が比較的短期で試験に入ることのできる食物回収試験での評価を行うこととし、接種前のデータ採取を実施している (図 1)。

指迷路試験装置



指迷路試験は報酬を回収するまでの手順の記憶力を評価する試験である。4段迷路の報酬穴にランダムにおかれたリンゴ片をエラーボックス(サルは回収不能となる)に落とすことなく、指先を用いてゴールに導き獲得する過程を評価する。
食物回収試験は目隠しをされた9つの穴にあるリンゴ片を間違いなく回収する手順を評価する方法で直前に触れた穴に触れることなく、リンゴ片を回収することのできる能力を評価する。

食物回収課題装置

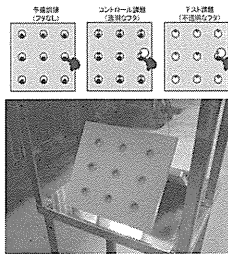


図1. 高次脳機能解析用装置

3) ウェ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、脳内接種群ではいずれも強陽性で検出されたが、発症前に安楽死を実施した、経口投与 (#5) および輸血を行ったサル (#13) ではいずれも検出されなかった。L-BSE 経口投与を行った2頭では最終投与日から4週目まで経時的に採取した糞便からは、最後の投与翌日は陽性、3、7日目は擬陽性、14日以降は検出限界以下であった(図2)。

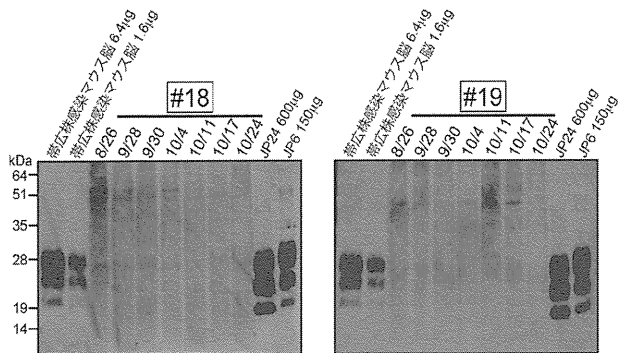


図2. 佐世保株 BSE 脳乳剤経口投与後のサル糞便中の PrP^{Sc}

4) 脳 MRI 画像解析

BSE 脳内接種カニクイザルでは全頭著しい脳室拡張を伴う萎縮の所見が認められた。一方、明らかな神経症状が認められず、安楽死を行った輸血接種および経口投与サルでは MRI に異常は認められなかった。

3次元 T1-MRI 画像を用いて、大脳白質、灰白室、脳室体積について質量解析を行い、病理組織所見における空胞変性領域とグリア増生領域と

の比較検討を行った。

5) PrP^{Sc} の免疫組織化学的染色と組織染色

図3に IHC で検出される PrP^{Sc} の沈着様式を示す。C-BSE 接種サルは空胞の周囲に多数の巨大プラークが存在する花弁状プラークが認められた。L-BSE 接種サルは微細顆粒が瀰漫性に沈着していた。

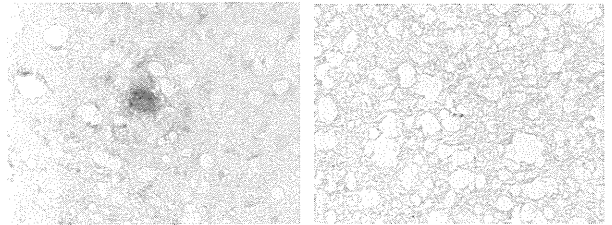


図3. 抗 PrP 抗体 (T-4) による PrP^{Sc} の検出

図6に BSE 脳内接種カニクイザルの MRI T2 強調画像、大脳、頭頂葉 HE 染色、GFAP 免疫染色、PrP^{Sc}(T-4)による免疫染色組織像を示す。右側の画像はそれぞれ、HE 染色像からの空胞変性領域の抽出、GFAP 染色によるグリア陽性細胞領域の抽出、抗 PrP 抗体 (T-4) 陽性領域の抽出を行った画像である。この抽出部位の面積について計測を行った。いずれのサルの脳においても HE 染色により高度の海綿状変性を確認することが出来た。特に L-BSE 接種群の灰白質における変性が顕著であった。中段に、GFAP 免疫染色により灰白質の顕著なアストロサイトの増生が認められた。各動物の灰白質、白質から無作為に抽出し撮影した組織像から空胞変性領域の面積率を計測したところ、灰白質領域においては L-BSE 感染サルにおいて著しい変性率を示した。MRI 画像から抽出した脳室領域比率との相関、灰白質領域との逆相関が認められた。しかし、空胞変性率と白質容積においても正の相関が認められた。

C-BSEサル脳乳剤接種

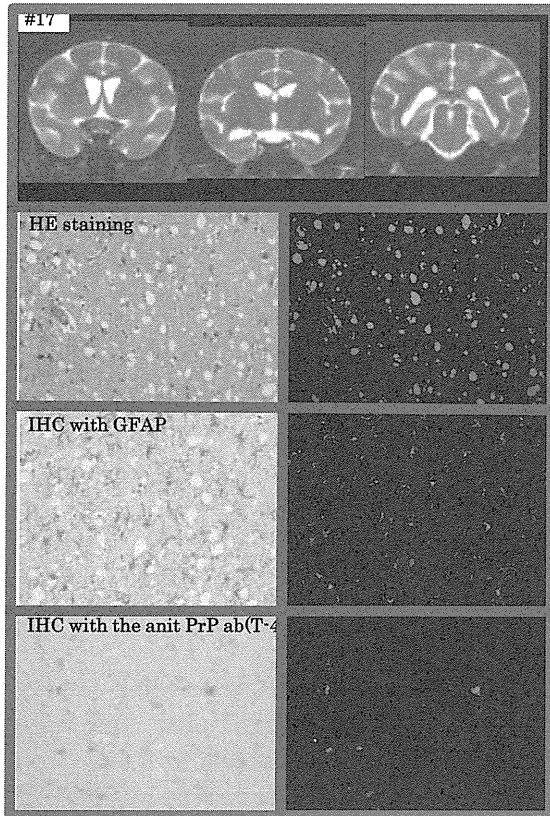


図 4-1. C-BSE 感染サル脳乳剤脳内接種サル (#17) の解剖時の MRI 所見と組織病理所見

白質領域における空胞変性率は灰白質に比べて低くいずれの個体も一定の数値を示していた。MRI 画像による脳容積との相関は脳室、白質との正の相関、灰白質と負の相関が認められた。GFAP 陽性領域の面積はいずれの個体も灰白質で高い数値を示していたが、MRI 画像解析による脳の容積とに相関は認められなかった。

D. 考察

BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルは顕著な神経症状を伴って全頭発症した。一方、C-BSE 牛脳乳剤経口投与サル、C-BSE 感染サル血液輸血サルにおいてはそれぞれ接種後 8 年、5 年を経過しているが、明らかな神経症状は認められていない。各群それぞれ 1 頭ずつ安楽死を行い、MRI 撮像、解剖し全身臓器を採取した。WB による蛋白解析、組織病理検索を行ったが、PrP^{sc} は検出されなかった。しかし、経口接種サルの結腸、延髄から、PMCA 法で PrP^{sc} が検出された。長期経過観察を行っている経口接種サル 2 頭、輸血サル 3 頭において、今後、多量の PBMC, CSF からの PrP^{sc} の検索を進めるとともに、高次脳機能検査として継続して、指迷路試験による、初期症状発現の有無について観察を続ける晩発性発症リスクについて

L-BSE牛脳乳剤接種

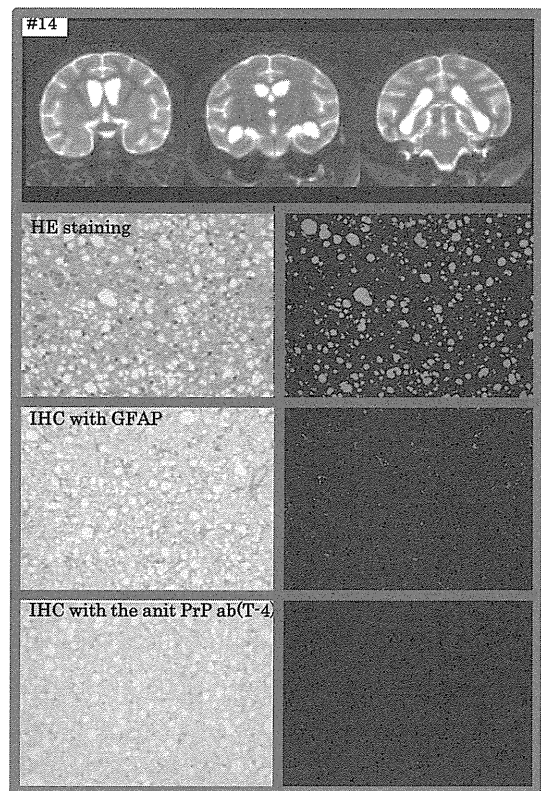


図 6-2 L-BSE 感染牛脳乳剤脳内接種サル (#14) の解剖時の MRI 所見と組織病理所見

表 3 MRI および病理組織像の画像解析

		MRI体積解析			病理組織面積解析			
		脳室	灰白質	白質	灰白質空胞変性領域	白質空胞変性領域	灰白質グリア領域	白質グリア領域
C-BSE	#016	0.4%	65.7%	33.9%	10.7%	3.0%	12.4%	9.1%
	#017	3.3%	62.3%	34.5%	9.5%	3.0%	13.5%	9.7%
L-BSE	#014	6.9%	50.6%	42.5%	33.5%	4.4%	18.5%	9.1%
	#015	7.9%	48.4%	43.7%	22.6%	3.9%	11.1%	10.9%
脳室容積率との相関					0.80	0.86	0.25	0.59
灰白質容積率との相関					-0.85	-0.91	-0.25	0.59
白質容積率との相関					0.87	0.92	0.24	0.52

て実験を継続する。

MRI による脳萎縮レベルと組織病理所見について画像解析を行ったところ、空胞変性量と脳の萎縮に相関が認められた。GFAP 染色陽性エリアとの比較では優位な相関は認められなかったが、今後グリア細胞数のとの相関について再検討を行う予定である。

脳内接種による C-BSE と L-BSE の感染病態は、臨床症状、組織病理所見において、それぞれ vCJD および孤発性 CJD に対応する所見が認められたことから、今後ヒトプリオン病を解明する上で有用と考えられることから、継代接種によるモデル確立を進めていく。

E. 結論

カニクイザルへの C-BSE および L-BSE 接種により、再現性の高い早期発症系モデルが確立した。

臨床症状および病理学的所見で、それぞれ、vCJD、孤発性 CJD (sCJD) に類似した特徴が認められたことから、継代を進め、発症モデル系として確立することにより、プリオン病の発症機序解明、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であると考えられた。

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材と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

- 1) Ono, F., Kurosawa, A., Yamakawa, Y., Tobiume, M., Sato, Y., Katano, H., Hagiwara, K., Itagaki, I., Komatuzaki, K., Emoto, Y., Hamano, M., Shibata, H., Yasutomi Y., Sata, T. Quantitative analysis of histopathological changes and brain atrophy using volumetric MRI in transmission of classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to cynomolgus macaques. Asian Pacific Prion Symposium 2011 (July 11 - 12, 2011, Karuizawa, Japan)

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