

7. プリオン形成に関わる体内因子の解析

研究分担者 堂浦 克美 東北大学大学院 医学系研究科

研究協力者 木村 朋寛 (東北大学大学院・医学系研究科)

西澤 桂子 (東北大学大学院・医学系研究科)

生田目 知尋 (東北大学大学院・医学系研究科)

研究要旨

プリオン(異常型プリオン蛋白)を制御する細胞環境を明らかにするため、セクレチン受容体を介するシグナル伝達経路の作用機序解析をプリオン持続感染細胞において実施した。cAMP 依存性キナーゼを介するセクレチン受容体・シグナル伝達経路がプリオンの制御に関与すること、正常型プリオン蛋白に直接作用する可能性がないことを明らかにした。一方、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化合物を発見した。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。これらはそれぞれ異なる細胞内経路でプリオンを制御しているものと考えられた。

A. 研究目的

プリオン(異常型プリオン蛋白)を制御する細胞環境を明らかにするため、セクレチン受容体・シグナル伝達経路の作用機序解析をプリオン持続感染細胞において実施した。また、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なる化合物を探索した。

B. 研究方法

セクレチン系との関連解析

セクレチンやセクレチン受容体に対する siRNA や遺伝子をプリオン持続感染細胞に導入し、プリオン形成の変動を調べた。また、特異的ペプチドや選択的阻害剤を培養液に加え、プリオン形成の変動を調べた。さらに、遺伝子発現産物とプリオン蛋白との相互作用を免疫沈澱法で解析した。

新たなツールの探索と機序解明

市販で入手可能なグリコシド化合物からプリオン持続感染細胞においてプリオン形成抑制効果のあるものを探索した。抑制効果のあるものについて、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ウェスタンブロット、フローサイトメーター、フローテーションアッセイにて調べた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、所属機関の許可を受けた後に、法令等を遵守し実施した。

C. 研究結果

セクレチン系との関連解析

プリオン持続感染細胞にセクレチンやセクレチン受容体に対する siRNA や遺伝子を導入し、セクレチン・シグナルの抑制がプリオン形成を抑え、その逆がプリオン形成を増強することを改めて確認した。また、特異的ペプチドを用いた実験からもセクレチン・シグナルがプリオンの形成維持に関与することを明らかにした。さらに、選択的阻害剤を用いた実験から、cAMP 依存性キナーゼを介するセクレチン・シグナル伝達経路がプリオンの制御に関与することを明らかにした。一方、セクレチン受容体とプリオン蛋白との相互作用を免疫沈澱法で解析したが、両者が相互作用している所見は得られなかった。

新たなツールの探索と機序解明

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。

D. 考察

今回の研究からcAMP依存性キナーゼを介するセクレチン・シグナル伝達経路がプリオンの制御に関与すること、正常型プリオン蛋白に直接作用する可能性がないことが明らかとなった。セクレチンは小腸粘膜で合成され、膵臓からの重炭酸塩の外分泌を亢進させる消化管ホルモンとして有名であるが、この27個のアミノ酸からなるペプチドホルモンの受容体であるセクレチン受容体は、膵臓以外にも脳内に広く分布しており、セクレチン受容体を介するシグナル伝達は脳機能に関わっていることが報告されている。セクレチン受容体欠損マウスでは自閉症様の症状が出現し、記憶が障害される。今回の成果をもとに、今後さらに解析を進めることにより、プリオンの制御に直接かかわるセクレチン受容体を介するシグナル伝達経路の分子群やインビボにおける関係性を明らかにできる。

一方、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化合物を発見した。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、セクレチン受容体シグナル伝達経路とは全く別の側面から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。

E. 結論

cAMP依存性キナーゼを介するセクレチン受容体・シグナル伝達経路がプリオンの制御に関与することを明らかにした。また、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化合物を発見した。この化合物は、セクレチン受容体・シグナル伝達経路とは異なる作用機序を持っていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda H, Sasaki K, Minaki H, Masui K, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T. Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion. *Neuropathology*. in press, 2011
- 2) Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M. Binding and Selectivity of the Marine Toxin Neodysiherbaine A and Its Synthetic Analogues to GluK1 and GluK2 Kainate Receptors. *J Mol Biol*. 413(3):667-683, 2011
- 3) Nguyen T, Sakasegawa Y, Doh-ura K, Go ML. Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur J Med Chem*. 46(7):2917-2929, 2011

2. 学会発表

国際学会

- 1) Sakasegawa Y, Nishizawa K, Oguma A, Doh-ura K. Acidic CC Chemokines are Upregulated in RML-Prion-Infected Neuroblastoma N2a Cells. *Prion2011* (May, 16-19, 2011, Montreal, Canada)
- 2) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Kimura T, Doh-ura K, Ando T, Ohmoto A. Anti-Prion Activity of Protein-Bound Polysaccharide K in Prion-Infected Cells and Animals. *Prion2011* (May, 16-19, 2011, Montreal, Canada)
- 3) Kimura T, Doh-ura K. Secretin receptor is involved in the abnormal PrP levels in prion-infected cells. *Asian Pacific Prion Symposium 2011*(July, 10-11, 2011, Karuizawa, Japan)
- 4) Hamanaka T, Doh-ura K. Structure-activity analysis of anti-prion isoprenoid compounds. *Asian Pacific Prion Symposium 2011*(July, 10-11, 2011, Karuizawa, Japan)

国内学会

- 1) 堂浦克美. ヤコブ病克服の基礎研究. 第5回食と医療の安全関わるプリオン病の市民講座 プリオン病・口蹄疫・インフルエンザ・放射能. 福岡, 2011年10月23日

2) 堂浦克美. プリオン病研究の最前線. 第 16 回
日本神経感染症学会学術集会. 東京, 2011 年 11
月 5 日

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

8. プリオンの細胞および組織における病理学的研究

研究分担者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部

研究協力者 佐藤 由子 (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

本研究では、宿主因子 peripherin のプリオン感染における作用機序について解析し、プリオン感染性を高感度に判定しうるマウス高感度バイオアッセイ系への応用について検討した。peripherin は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プリオン感染感受性細胞に高発現なタンパク質として同定された。培養細胞を用いた検討では 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ことが示唆された。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。結果、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され、低濃度プリオン接種においても安定的にプリオン病発症を観察出来た。以上より、微量プリオンを検出しうるバイオアッセイ系としての有用性を確認出来た。また、プリオンの細胞内での動態の把握はプリオンの伝播、組織内での蓄積様式解明に必須であると考えられる。アミロイド検出試薬 FSB を用いることで、生細胞内でのプリオン動態を観察出来る事を明らかにした。

A. 研究目的

本研究は、プリオン感染を制御する宿主因子の同定を目的とし研究を行う。プリオン感染を制御する宿主因子の同定は、現在治療法の存在しないプリオン病の治療標的を提示するのみならず、プリオンの宿主生体内、細胞内での生活環解明に寄与するものとする。また、同時に研究班で展開するサル等の動物を用いた感染実験において、プリオン株の違いによる病理学的所見の差異、髄液中のプリオン病マーカーの推移を解析することで、定型・非定型 BSE 由来プリオンの誘導するプリオン病の正確な病態把握、診断技術向上に寄与する事を目的とする。

B. 研究方法

1) peripherin トランスジェニックマウスでのプリオン病態の進行促進

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後、マウス順化 BSE 由来プリオンを脳内接種し、その後の病態の進行について C57BL6 マウスとの比較検討を行った。また、発症前に経時的に採材し、プリオン蓄積時期について検討した。

2) 生細胞におけるプリオン動態の解析

チャンドラー株感染マウス脳乳剤を N2a 細胞へ添加し、アミロイド検出試薬 FSB により検出出来るか否かについて検討した。プリオンを特異的に検出しているか否かについては、固定後に 6H4 抗プリオン抗体を用いて 2 重染色し特異性について検討した。

3) 定型 BSE プリオン経口接種サルの病理学的解析

本邦で確認された定型 BSE プリオンを経口的に接種されたカニクイサルの解剖後の脳組織のプリオンに対する免疫染色を含めた病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験に関して国立感染症研究所・実験動物委員会の定める規程を遵守するとともに、動物愛護法の精神に沿い、研究を遂行した。

C. 研究結果

1) peripherin トランスジェニックマウスでのプリオン病態の進行促進

peripherin トランスジェニックマウス4系統すべてにおいてプリオン病態進行が促進された (図 1a)。また、脳内への蓄積時期も C67BL6 に比べ早期より認められた (図 1b)。病態末期でのプリオンの中枢組織への蓄積量、空包変性等のプリオン病特異的な所見にトランスジェニックマウスと対照マウス間に差異は認められなかった。低濃度プリオン接種 (0.002%脳乳剤 20ul 脳内接種) において、C57BL6 マウスでは未発症、発症時期の個体間での解離が認められたが、peripherin トランスジェニックマウスでは全頭が対照マウスより早期に発症した (図 1c)。

2) 生細胞におけるプリオン動態の解析

チャンドラー株感染マウス脳乳剤と FSB (0.0001%) を混合し N2a 細胞培養液中へ添加し、2 時間後のプリオンの細胞内局在を観察した。結果、FSB 特異的な蛍光が核周囲に認められた。固定後に抗 6H4 プリオン抗体を用いて 2 重染色したところ、FSB および 6H4 抗体のシグナルは一致した (図 2)。

3) 定型 BSE プリオン経口接種サルの病理学的解析

臨床的に特異な症状は呈していなかった。中枢神経系を含めた各臓器を採取し、病理学的な検索を行った。プリオン特異的な抗体を用いた免疫組織化学的検索ではプリオンの蓄積はできなかった。HE 染色による組織病理学的な検索においても著変は認められなかった。

D. 考察

1) peripherin トランスジェニックマウスでのプリオン病態の進行促進

培養細胞を用いた研究では peripherin はプリオン非感受性細胞のプリオン感染感受性を回復しなかった。しかしながら培養液中へ添加されたプリオンの細胞内への取り込みを増強した。全身性に peripherin を強発現するトランスジェニックマウスでは対照マウスに比べプリオン病の進行促進が認められプリオンの蓄積も早期より認められた。病態末期でのプリオンの蓄積量、病理

組織像に対照群との差異は認められないことから、トランスジェニックマウスでのプリオン病態の促進は強発現された peripherin によるプリオンの効率的な取り込みの結果と推察された。

2) 生細胞におけるプリオン動態の解析

FSB は細胞内へ取り込まれたプリオンを特異的に検出可能なことが明らかとなった。生細胞には正常型プリオンも存在するため、FSB によるプリオン検出は細胞内でのプリオン動態解析に有用と考えられる。しかしながら、持続感染成立後の細胞では FSB により特異的なシグナルは検出されなかった。これは持続感染細胞ではプリオンがアミロイド構造を有していない事に起因すると考えられる。

3) 定型 BSE プリオン経口接種サルの病理学的解析

プリオン特異的な抗体を用いた免疫組織化学的検索では、経口接種サルにおいてプリオンの蓄積は認められなかった。組織病理学的にも著変は認められず、プリオン病の発症、前段階のプリオンの蓄積は無いものと考えられた。しかしながら、PMCA 法を用いたプリオン検出では末梢組織でのプリオンの存在が証明されており、プリオンが中枢神経系に至るまでにはさらに時間が必要と考えられた。

E. 結論

Peripherin トランスジェニックマウスでは微量プリオン接種においても高効率にプリオン病発症を誘導できることが明らかとなった。現在、微量プリオンの存在の証明には PMCA 法、Quick 法が用いられているがプリオンの感染性については判別出来ない。本研究で得られた peripherin トランスジェニックマウスはプリオンの感染性を高感度に評価出来る系として有用であると考えられる。また、FSB を用いた生細胞でのプリオン染色により、取り込み過程における peripherin の関与について解析を行い、その分子機序等の解明を進める。

経過観察中のプリオン経口接種サルについては、髄液中の 14-3-3 等プリオン病マーカーの検索を行い、発症後に詳細な解析を行う。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, RH., Tobiume, M., Sato, Y., Sata, T., Gouras, GK., Takahashi, H. Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology*. 2011 Jun;31(3):208-14.
- 2) 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;64(1):81-4.
- 3) Ono, F., Terao, K., Tase, N., Hiyaoka, A.,

Ohyam., 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*. 2011;64(1):50-4

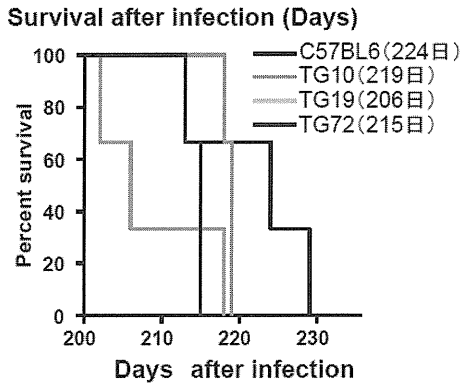
2. 学会発表

特記事項なし

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1a



脳乳剤0.02%脳内接種後の各TGマウスの生存曲線

図1b

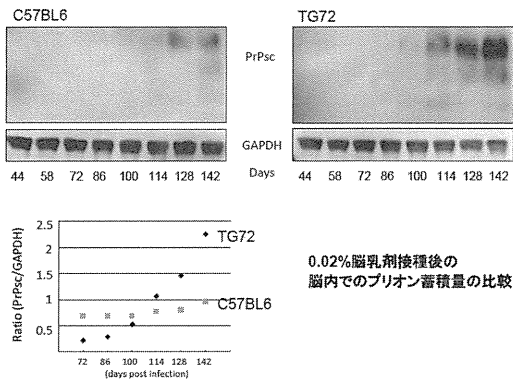
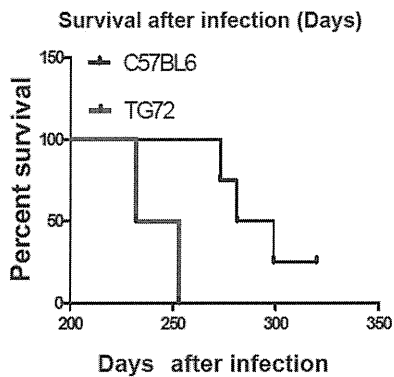
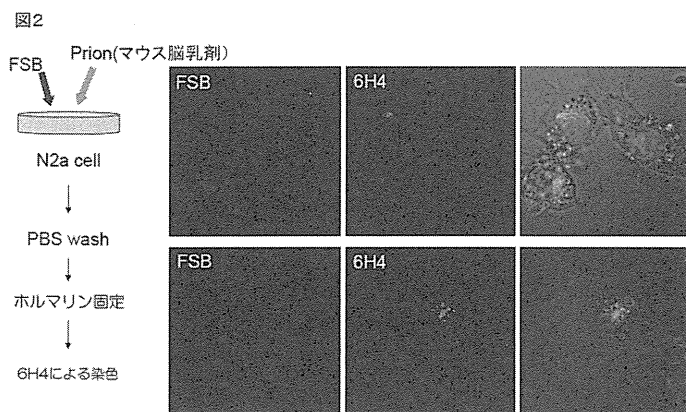


図1c



脳乳剤0.002%脳内接種後のTGマウスの生存曲線



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

研究分担者 萩原健一 国立感染症研究所・細胞化学部

研究協力者 大内史子 (国立感染症研究所・細胞化学部)

原 英之 (国立感染症研究所・細胞化学部)

研究要旨

プリオン蛋白質には Asn 結合型糖鎖修飾部位が 2 箇所存在する (Asn¹⁹²、Asn²⁰⁸) が、JP24 (Sasebo)の脳神経系に蓄積した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は、SDS-PAGE / ウェスタンブロット分析により検出される PrP^{Sc} の糖鎖型 (無糖鎖、1 糖鎖、2 糖鎖) のうち 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。この特徴は、従来型 BSE プリオン由来の PrP^{Sc} の糖鎖型の特徴とは明らかに異なり、非定型 BSE プリオンと従来型 BSE プリオンとの病原体の性状の相異に関わっていると予想される。本研究では、非定型 BSE プリオンの 1 糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖修飾が、どちらか片方に Asn 残基に偏っているのか、それとも 2 箇所の Asn 残基がほぼ同率で修飾を受けているのかについて解析を進めた。

A. 研究目的

JP24 (Sasebo)の脳神経系に蓄積した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は、SDS-PAGE / ウェスタンブロット像が 1 糖鎖型の高い存在比を示す (2 糖鎖型バンド強度: 1 糖鎖型バンド強度 \approx 1:1.1)。また、JP24 の脳組織には PrP^{Sc} のアミロイドプラークの形成が認められ、従来型 BSE の罹患ウシの病理組織像とは異なる [Hagiwara K, *et al*, *Jpn J Inf Dis* 60: 305, 2007]。さらに、これまでの実験的伝播試験から、この非定型 BSE プリオンが古典的 BSE (C-BSE)プリオンとは異なる病原性をもつことが明らかになってきた [Masujin K, *et al*, *Prion* (2008) 2: 123、厚生労働科学研究費補助金「食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究 (H20-

食品-一般-008) 』報告書、など]。しかし、PrP^{Sc} の蛋白質化学的な知見は、SDS-PAGE / ウェスタンブロット分析での糖鎖型の相違や泳動度の相違が指摘されている程度にとどまる。本研究では、非定型 BSE プリオンの特徴である 1 糖鎖型 PrP^{Sc} に注目し、この 1 糖鎖型 PrP^{Sc} においては糖鎖付加部位がどちらか一方の Asn 残基に偏っているのであろうか? という疑問点を明らかにすることを目的とする。現在、PrP^{Sc} 凝集体の推定構造モデルとしておおまかに 2 つのモデルが提唱されている (β -helix モデルと spiral モデル; Govaerts C, *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8342, 2004、DeMarco ML, *et al*, *Biochemistry* 45:15573, 2006) が、モデルの構成単位は従来型 BSE プリオンの主要

な糖鎖型である2糖鎖型 PrP^{Sc}を想定しているように思われる。本研究では、これらのモデルを念頭に置き、1糖鎖型 PrP^{Sc}が混在する非定型 BSE プリオンと従来型 BSE プリオンの両者の凝集体構造についての比較・考察を深めるために、非定型 BSE プリオンの糖鎖修飾部位についての生化学的情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) マススペクトロメトリーによる解析
糖蛋白質を SDS-PAGE 後にゲル内でトリプシンなどの蛋白質分解酵素により消化後、糖鎖をもつペプチド断片を ZIC-HILIC カラムによるカラムクロマトグラフィー操作（親水性相互作用クロマトグラフィー）により回収する。回収後のペプチド断片を含む溶液をの溶媒を減圧下にて留去後、H₂¹⁸O 中にてペプチドを peptide: N-glycosidase F (PNGase F) とインキュベートし、脱グリコシル化の加水分解反応により Asn 残基を ¹⁸O 同位体で標識した。この試料を MALDI-TOF 質量分析機（島津製作所 AXIMA-QIT）、または液体クロマトグラフ（Michrom Bioresources、MAGIC2002）と接続した ESI-四重極質量分析機（Thermo Fisher Scientific、LCQ Deca XP）にかけて、観測される質量数が ¹⁶O よりも ¹⁸O 同位体の分だけ重い標識ペプチド断片の検索を行うことにより、元の糖鎖修飾部位の同定を試みた。

2) ウェスタンブロット法による解析

ウシ PrP を lysyl endopeptidase により消化すると、2箇所の糖鎖修飾候補の Asn 残基が2つの異なるペプチド断片に分割できる。このうち Asn¹⁹² を含む断片 (His¹²²-Lys¹⁹⁶) は、抗 PrP 抗体 L42 や SAF84 により検出可能であり、もしも Asn¹⁹² が糖鎖修飾を受けているならば、SDS-PAGE/ウェスタンブロット分析において His¹²²-Lys¹⁹⁶ 断片の泳動度のシフトとして捉えることができる。このような考えに基づいた解析を行った。

BSE 罹患ウシ (JP6、JP24) 脳組織の 10% ホモジネート（リン酸緩衝生理食塩水）300 μL に 2-butanol 25 μL、4% Zwittergent/1% sarkosyl/50mM Tris HCl/100mM NaCl (pH7.5) 300 μL、DNase I

(Roche) 3 μL、collagenase (1mg/mL、和光純薬) 15 μL を加えて 37°C にて 30 分間インキュベート後、proteinase K (Roche、600unit/mL) 7 μL を追加添加して 37°C にて 30 分間酵素消化した。消化反応後、butanol/methanol (5/1、v/v; 3mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む) 300 μL を添加し、12,500xg にて 15 分間遠心操作を行い、沈殿 (PrP^{Sc} を含む) を得た。沈殿を 6M 塩酸グアニジン/0.1M NaHCO₃ 70 μL に溶解し、0.85M tris[2-carboxyethyl]phosphine を添加し、室温・一晩静置してジスルフィドを還元後、0.5M iodoacetamide 7 μL を添加し（終濃度 50mM）、Cys 残基チオールアルキル化を行った。反応液に氷冷 ethanol を 600 μL 添加・混和後、12,500xg にて 15 分間遠心操作 (4°C) し、得られた沈殿を 0.1% SDS 100 μL に溶解（わずかに不溶物が残る）し、一部を lysyl endopeptidase (1unit; 和光純薬) による消化反応にかけた (37°C、1-5 時間)。この lysyl endopeptidase 消化物を改変 SDS-PAGE* / ウェスタンブロットにかけ、目的とする消化断片を L42 (R-Biopharm) や SAF84 (Cayman) を用いて検出した。

* Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed, John Wiley & Sons, Inc., 2002.

（倫理面への配慮）

プリオンの取扱いは国立感染症研究所のバイオセーフティ関連規約を遵守した。

C. 研究結果

1) マススペクトロメトリーによる解析

最初に α1 酸性糖蛋白質（分子上の 5 箇所の部位に Asn 結合型糖鎖が存在することが知られている）をモデルとして、発案した分析法が実行可能であるか否かを評価した。その結果、0.5 μg の α1 酸性糖蛋白質を出発材料としてトリプシン消化を行うことにより、糖鎖修飾部位が ¹⁸O 同位体により標識されたペプチドを質量分析スペクトル上に検出できた。そこで、この方法を PrP に適用したところ、次の2点が問題となった。

・大腸菌で発現させたリコンビナント PrP（糖鎖修飾が無い）に対して試験したところ、Asn²⁰⁸ を含むトリプシン消化ペプチド断片は回収・検

出できたが、Asn¹⁹² 含有断片の回収率が著しく低い（ほぼ検出できない）ことがわかった。低い回収率の原因は、目的ペプチドの溶解性に起因すると考えられた。

- PrP^{Sc} を試料として試験したところ、罹患ウシ（JP6、JP24）脳組織に含まれる PrP^{Sc} 量が本法の検出限界以下であることがわかり、検出感度の改善が必要となった。

以上の2点から、罹患ウシ（JP6、JP24）への本法の適用は容易ではないと考えられた。

2) ウェスタンブロット法による解析

マスマスプロトメトリーによる解析が困難であったため、ウェスタンブロット法による解析を検討した。本法は、理論上、Asn¹⁹² の糖鎖修飾率と L42 や SAF84 により検出される Asn¹⁹² 含有断片（His¹²²-Lys¹⁹⁶）のバンドのシグナル強度との間に相関があることに基づく解析方法である。His¹²²-Lys¹⁹⁶ 断片のシグナル強度の実測値と理論上のシミュレーション値とを比較・照合することにより、Asn¹⁹² の糖鎖修飾率を推定することができる。これまでの実験の測定値より、従来型 BSE（JP6）の1糖鎖型 PrP^{Sc}、ならびに非定型 BSE（JP24）の1糖鎖型 PrP^{Sc}、いずれについても Asn¹⁹² への糖鎖修飾率は低く、1糖鎖型分子種の糖鎖修飾は専ら Asn²⁰⁸ に起きているという結果が得られた。

D. 考察

ウェスタンブロット法による解析から、従来型 BSE（JP6）の1糖鎖型 PrP^{Sc}、ならびに非定型 BSE（JP24）の1糖鎖型 PrP^{Sc}、いずれについても Asn¹⁹² への糖鎖修飾率は低く、1糖鎖型分子種の糖鎖修飾は専ら Asn²⁰⁸ に起きていることが示唆された。結論的断定は現時点では尚早であるが、この結果から以下の点が考察される。

- β -helix モデルあるいは spiral モデル (Govaerts C, *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 101:8342, 2004、DeMarco ML, *et al*, Biochemistry 45:15573, 2006) では、従来型 BSE プリオンの主要な糖鎖型である2糖鎖型 PrP^{Sc} を想定した凝集体構造を取り扱っている。これらのモデル構造から Asn²⁰⁸ に糖鎖が付加した1糖鎖型 PrP^{Sc} が凝集体中におよそ 1:1 の比率で混在するモデルを組立て

ることにより、非定型 BSE プリオンの凝集体構造が演繹できるのではないかと期待された。

- BSE 罹患ウシでの PrP^{Sc} の1糖鎖型の糖鎖が主として Asn²⁰⁸ に検出されたのは、そもそも健康ウシ PrP^C の1糖鎖型の糖鎖修飾が主として Asn²⁰⁸ に限られているためである、という可能性が考えられる。健康ウシ PrP^C の1糖鎖型の糖鎖修飾情報については不詳であるが、Asn¹⁹² への糖鎖は Asn²⁰⁸ の糖鎖付加があってはじめて付加されるという段階的修飾を経るのかもしれない。なお、文献的には、健康ウシ PrP^C から精製した PrP^C は主として2糖鎖型であったという (García FL *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 97:8334, 2000)。

E. 結論

マスマスプロトメトリーによる解析は、 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白質を用いたモデル系では有効であったが、PrP^{Sc} 試料への適用は難しく、手法上の大きな改良が欠かせないことがわかった。一方、ウェスタンブロット法に基づく解析により、従来型 BSE（JP6）でも非定型 BSE（JP24）でも、1糖鎖型 PrP^{Sc} 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た。ウェスタンブロット法による解析データは更なる精密化と慎重な解釈が必要であり、また、Asn¹⁹² の糖鎖の有無の検証にしか着目しているという難点がある。確固たる結論を得るためには、相補的に Asn²⁰⁸ の糖鎖付加の有無についての情報を得て、両者のデータを統合して判断することが必要である。このためにも Asn²⁰⁸ の糖鎖付加の有無についての検証を行う方法論の開発が、今後の課題であると考えられる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
 - 1) Okemoto-Nakamura, Y., Hara, H., Shinkai-Ouchi, F., Yamakawa, Y., Hanada, K., and Hagiwara, K. Analysis of synaptic proteins and cdk 5 in prion

protein-deficient cells. Prion 2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)

- 2) Hara, H., Okemoto-Nakamura, Y., Shinkai-Ouchi, F., Yamakawa, Y., Hanada, K., and Hagiwara, K. Identification of novel PrP epitope modulating conformational change from PrPC to PrPSC. Asian Pacific Prion Symposium 2011 (July, 10-11, 2011, Karuizawa, Japan)
- 3) 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., and 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, 10-11, 2011, Karuizawa, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

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

研究分担者 福田 茂夫 道総研 畜産試験場 基盤研究部

研究協力者 陰山 聡一 道総研 畜産試験場 基盤研究部

藤井 貴志 道総研 畜産試験場 基盤研究部

研究要旨

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ことを目的として、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。また対照動物 (n=3) として、BSE 陰性を確認した 10% 牛脳乳剤を同様に 1ml 脳内接種した。接種前に BAEP を測定したところ、波間潜時は I-III 間 2.03 ± 0.12 ms、III-V 間 1.05 ± 0.12 ms、I-V 間 3.08 ± 0.11 ms で成牛とほぼ同じ値であった。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。

A. 研究目的

飼料規制などの管理措置により定型 BSE の発生は減少している。しかし、定型 BSE と性状の異なる非定型 BSE が欧米諸国で多数報告され、国内でも 2 例の BSE 患畜が非定型 BSE と確認された。非定型 BSE の発生原因やその病原体については不明な点が多く、孤発性である可能性もあり、食肉における安全を維持する上で牛における非定型 BSE の病態および病原体の性状を解明することが必要である。これまでの研究で、脳内接種による非定型 BSE 感染牛は、起立困難、歩様踳踉などの症状の発現が、定型 BSE 感染牛と比較して早く、また、異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積も早期に観察されること、黒毛和種における症状の発現および PrP^{Sc} の蓄積は、ホルスタイン種と同様であることが明らかとなった。一方、頭を下げる姿勢や歩様異常などこれまでに定型 BSE の指標としていた臨床症状は、明瞭ではないことも明らかとなった。

非定型 BSE のリスク低減のため、非定型 BSE 感染牛の臨床的変化を発見する方法の確立が求められる。

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、聴性脳幹誘発電位 (BAEP) 測定を行い、臨床症状の客観的評価基準に資するデータを作成する。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。

B. 研究方法

1) 脳内接種による BSE 感染牛の作出

北海道十勝管内の BSE 非発生農場よりホルスタイン種雌 6 頭を導入した。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 感染牛とした。また対照動物 (n=3) として、BSE 陰性を確認した 10% 牛脳乳剤を同様に 1ml 脳内接種した。接種は BSE 感染実験室 (動物バイオセーフティー基準 (ABSL) 2) にて行い、BSE 感染牛の飼養及び観察は、フリーバーン方式専用隔離牛舎 (ABSL1) にて行った。

2) 非定型 BSE プリオン感染牛の臨床症状の評価法の検討

供試牛の臨床症状を毎週観察するとともに、接種前、接種後 1、3 ヶ月に血液、唾液および尿を採取した。また、供試牛の BAEP を測定接種前に解析した。

2009 年 5 月に非定型 BSE (L 型 : BSE/JP24) を接種し 2010 年 9 月に解剖した供試牛 (ID : 7434) について、接種後 15 ヶ月時の歩数計による行動量についてデータ解析を行った。

(倫理面への配慮)

サンプル採取および分析は、研究従事者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) 脳内接種による BSE 感染牛の作出

ホルスタイン種雌 2 頭に非定型 BSE (BSE/JP24 Serial)、ホルスタイン種 1 頭に定型 BSE (BSE/JP05) を接種し、BSE 感染実験牛を作出した (表 1)。対照として黒毛和種雌 1 頭とホルスタイン種雌 1 頭に BSE 陰性を確認した牛脳乳剤を接種した。BSE 感染実験牛は、平成 24 年 1 月 31 日現在において、臨床上的異常所見はない。

表 1 脳内接種による BSE 感染牛の作出

No	品種	接種材料	接種月
5184	Hols	BSE/JP24 Serial	2011/07
6802	Hols	BSE/JP24 Serial	2011/07
6697	Hols	BSE/JP05	2011/08
5795	Hols	BSE 陰性	2011/08
5582	Hols	BSE 陰性	2011/09
9050	Hols	BSE 陰性	2011/09

Hols : ホルスタイン種

2) 非定型 BSE プリオン感染牛の臨床症状の評価法の検討

接種前に供試牛 6 頭の BAEP を測定したところ、I 波 $1.41 \pm 0.06\text{ms}$ 、II 波 $2.41 \pm 0.12\text{ms}$ 、III 波 $3.44 \pm 0.15\text{ms}$ 、V 波 $4.49 \pm 0.15\text{ms}$ であった (平均 \pm SD)。また各波間潜時は I-III 間 $2.03 \pm 0.12\text{ms}$ 、III-V 間 $1.05 \pm 0.12\text{ms}$ 、I-V 間 $3.08 \pm 0.11\text{ms}$ であった。(表 2)

非定型 BSE 接種牛 (ID :7434) の接種後 15 ヶ月時 (解剖の 2~3 週間前) 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。(図 1)

D. 考察

子牛の BAEP は報告が少ない。ホルスタイン種成牛 (Arai ら、2008) の成績と比較し、刺激音から I 波までの時間短い傾向にあったが、I、III、V

波の各波間潜時は成牛とほぼ同じ値であった

非定型 BSE 接種牛 (ID :7434) は時折音に過剰反応する、採血時等に抵抗する等の変化が確認されていた。夜間の行動量の増加と BSE の症状との関連は不明であるものの、行動量の測定が神経疾患の監視ができる可能性が示された。

E. 結論

これまでに、脳内接種による非定型 BSE 感染牛は、接種後およそ 11 ヶ月 ($344 \pm 14\text{dpi}$) で症状を現すことから、次年度に臨床症状等の観察ができるものと思われる。

BAEP 及び行動量による BSE の臨床症状の解析についてはさらにデータの蓄積が必要である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuda, S., Onoe, S., Nikaido, S., Fujii, K., Kageyama, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Yoshioka, M., Murayama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T., Okada, H. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Jpn J Infect Dis.* 65(1): 37-44, 2012
- 2) Fukuda, S., Okada, H., Arai, S., Yokoyama, T., Mohri, S. Neuropathological Changes in Auditory Brainstem Nuclei in Cattle with Experimentally Induced Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Comp Pathol.* 145(2-3): 302-307, 2011

2. 学会発表

- 1) Fukuda, S., Okadam H., Arai S., Kageyamam S., Yokoyama, T., Mohri, S, Neuropathological changes in auditory brainstem nuclei in cattle with experimentally induced bovine spongiform encephalopathy. Prion2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 2) 福田茂夫、岡田洋之、新井鐘蔵、陰山聡一、横山隆、毛利資郎、「脳内接種 BSE プリオン感染牛の聴覚神経路病変」日本家畜感染症学会学術集会、札幌市、2011 年 12 月 2-3 日

3) 福田茂夫「北海道における BSE 研究」日本獣医師会獣医学術学会年次大会、市民公開シンポジウム、札幌市、2012 年 2 月 3-5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。

接種前の供試牛のBAEP		ホルスタイン種のBAEP	
	Peak Latency (ms)		Peak Latency (ms)
I	1.41 ± 0.06	I	1.52 ± 0.05
II	2.41 ± 0.12	II	2.49 ± 0.08
III	3.44 ± 0.15	III	3.55 ± 0.10
V	4.49 ± 0.15	V	4.62 ± 0.05
I-III	2.03 ± 0.12	I-III	2.03 ± 0.07
III-V	1.05 ± 0.12	III-V	1.08 ± 0.08
I-V	3.08 ± 0.11	I-V	3.11 ± 0.05
音圧レベル: 105dB ホルスタイン種		音圧レベル: 105dB Arai et al. (2008)	

表 2 接種前の供試牛 6 頭の聴性脳幹誘発電位 (BAEP) 測定

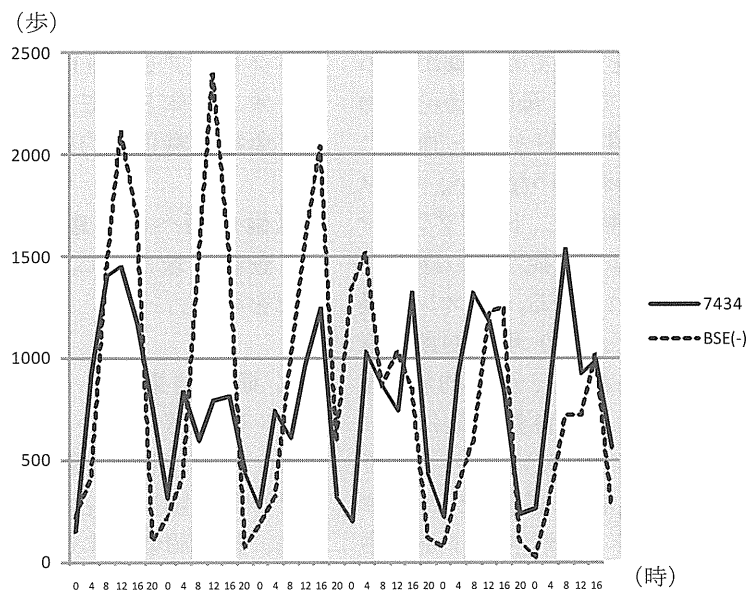


図 1 非定型 BSE 接種牛 (ID:7434) の行動量解析
4 時間毎の歩数を対照牛 (BSE (-)) と比較
グレー: 夜間帯 (18~6 時)

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

研究分担者 室井 喜景 帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門

研究要旨

プリオン感染動物の評価として、BSE およびスクレイピー株を経口接種したマウスについて、妊娠から産仔の病態を含め検討することを計画した。本年度は、感染・妊娠動物のプリオンの分布について検討した。免疫組織化学的に、胎盤および乳腺は陰性だった。消化管神経叢では BSE 牛やスクレイピーヒツジの病態を反映していなかったが、スクレイピー感染マウスでは消化管神経叢に陽性所見がみられるのに対して、BSE 感染マウスでは陰性であった。

A. 研究目的

BSE については多くの実験から経胎盤感染やミルクを介しての感染は否定されているが、同じ動物プリオン病であるスクレイピーや北米を中心に拡大傾向にある鹿の慢性消耗病 (CWD) については、群れの中でどのように感染が拡大しているか不明である。経胎盤感染、ミルクあるいは唾液を介しての感染が疑われているが、議論がある。胎盤では、母胎側からの物質の移行を抑制する働き(胎盤関門)があり、血管による直接的な物質移行は行われていないが、マウスでは免疫抗体が経胎盤により移行し、トキソプラズマやネオスポラなどの原虫、ブルセラ症などの経胎盤感染症がモデルとして構築されている。プリオンの経胎盤感染の可能性については、1970 年代初期に脳内接種マウスを用いての報告があり、否定的と結論づけられている。しかしながら、より自然感染に近い経口感染モデルでの検討はなされていない。そこで、実験動物の感染研究としては、経口感染モデルの評価として、1) スクレイピーと BSE プリオンを経口感染させたマウスのプリオン分布 2) 感染動物から、産仔を得て、経胎盤感染や経乳感染が成立するかどうか、3) 母親から子に伝えられる抵抗性がプリオン感染において成立するのかを明らかにすることを目的とした。このうち本年度は、胎盤や乳腺にプリオンが蓄積するのか含め、二種類のプリオン株間でプリオン沈着臓器に差異が生じるのかを検討した。

B. 研究方法

1) 経口感染マウスの PrP^{Sc} 分布
スクレイピー帯広株、BSE (JP4) マウス馴化株 10%脳乳剤 100 μ l をそれぞれ ICR マウス (♀) 14 匹に自然給餌により投与した。投与後、220、

270 日に交配した。このうちの 4 匹について、分娩前に解剖し、胎盤および乳腺を含む全身臓器のホルマリン材料を採取した。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(135DWHA 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。

(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) 経口感染マウスの PrP^{Sc} 分布
脳、脊髄、脊髄神経節、脾臓、乳腺を含む付随リンパ節に陽性所見が得られた(図 1)。肝、腎、心、肺、脾、胎盤および乳腺は陰性であった(表 1)。横隔膜を含む骨格筋も陰性であった。スクレイピー感染マウスでは副腎髄質に陽性所見が得られたが、BSE では確認できなかった。スクレイピー感染マウスでは消化管神経叢のうち、空回腸、盲腸、結腸の筋層間神経叢に陽性所見が得られたが(図 2)、舌、胃、十二指腸は陰性だった(表 2)。BSE 感染マウスでは、消化管神経叢はいずれの部位についても陰性を示した。

D. 考察

1) 経口感染マウスの PrP^{Sc} 分布
今回の検索では、BSE およびスクレイピーともに感染マウスの胎盤、乳腺にはプリオンの沈着は認

められなかった。BSE 感染牛における報告はみあたらないが、スクレイピー感染ヒツジでは胎盤、血液、ミルクを介しての伝達が可能なことが報告され、胎盤におけるプリオンの沈着も免疫組織学的に栄養膜細胞に証明されている。胎盤のプリオンの沈着の有無は垂直感染に直接関与しないと考えられるが、感染性を有する後産の摂取やそれによる土壌汚染は産仔や群内の水平感染に貢献すると考えられる。今回の結果から、マウスでは胎盤摂取による感染は起こらないと結論された。一方、感染マウスでは脾臓や付属リンパ節に陽性がみられた。経時的な検索は実施していないが、消化管より侵入したプリオンは腸管から腸間膜リンパ節、リンパ路に入り、その後血行性に拡がり、さまざまな臓器を経由して、乳腺リンパ節を含む多くの付属リンパ節に拡がっていることが推察された。そのことから、乳腺組織自体にはプリオンの沈着は確認できなかったが、スクレイピーヒツジと同様にマウスでは乳汁を介しての感染の可能性については否定できず、来年度検討を実施する。

スクレイピーヒツジでは、食道から直腸に至る神経叢が陽性を示し、BSE 牛では回腸神経叢（実験例ではパイエル板にも）に陽性がみられることが報告されている。本研究におけるマウスの消化管神経叢におけるプリオンの分布は過去の C57BL/6 マウスを用いた感染モデルの報告に一致したが、いずれもヒツジや牛の病態を再現していなかった。このような消化管の組織分布や株間の違いに

ついては、プリオンの求心性、遠心性の拡がりの中で、今後検討をしていく予定である。

E. 結論

BSE およびスクレイピー経口感染マウスでは、胎盤、乳腺にプリオンの沈着はみられなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 坂口翔一, 室井喜景, 堀内基広, 古岡秀文. BSE 伝達モルモット小脳におけるプリオン沈着と神経伝達物質に関する病理学的研究. 第 152 回日本獣医学会 (2011 年 9 月, 大阪府立大)

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

	BSE	Scrapie
脾・リンパ装置	+	+
肝・腎・心・肺・膵	-	-
骨格筋・横隔膜	-	-
脳・脊髄・神経節	+	+
副腎髄質	-	+
消化管神経叢	-	+
胎盤	-	-
乳腺	-	-

表1 感染動物のプリオン分布

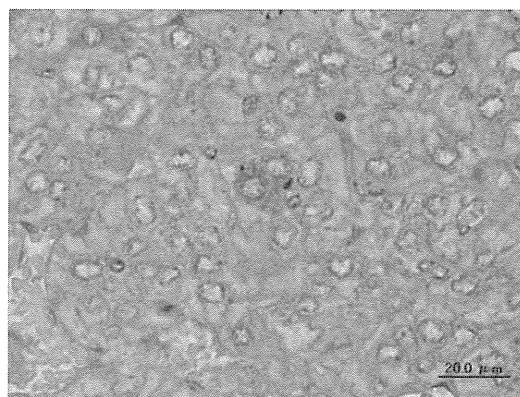


図1 スクレイピー感染マウス副腎髄質での陽性所見

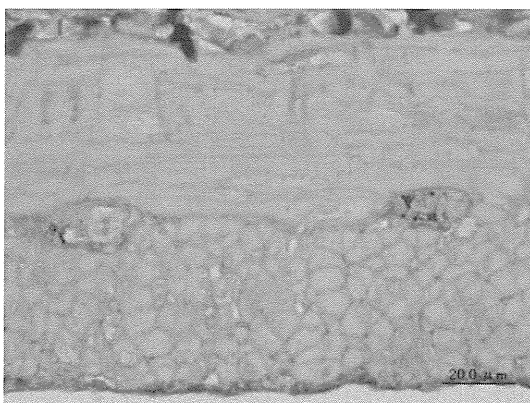


図2 スクレイピー感染マウス空回腸筋層間神経叢の陽性所見

筋層間神経叢	BSE	Scrapie
舌	-	-
食道	NE	NE
胃	-	-
十二指腸	-	-
空回腸	-	+
盲腸・結腸	-	+

表2 消化管におけるプリオン分布

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

分担研究者 村山 裕一 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者 柴田 宏昭 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)

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)

研究要旨

本研究では、ヒトへの BSE 感染のリスク解明や生前・早期診断法の開発・評価に適していると考えられる霊長類モデルを用いて、PMCA 法による解析を経口投与サルや輸血サルに適用し、PrP^{Sc} の体内分布・動態を明らかにすることを目的とする。本年度は、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^{Sc} 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^{Sc} 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、PrP^{Sc} の局在が限定的であったにもかかわらず、延髄にも PrP^{Sc} が認められたことから、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^{Sc} 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。経口感染モデル系に加えて、定型 BSE 感染サルを輸血ドナーとした輸血感染モデル系の解析も開始した。未発症のまま輸血後 5 年弱で安楽死させたサルの体液 (血清、血漿、白血球および脳脊髄液) からは PrP^{Sc} は検出されなかった。さらに、非定型 BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} 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、上記 PrP^{Sc} の増幅効率が改善された。

A. 研究目的

これまでに、定型 BSE を接種したカニクイザルに由来する異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の PMCA 増幅法を確立し、脳内接種サルにおいて、脳脊髄液 (発症初期～末期) や白血球 (発症中期～末期) から PrP^{Sc} が検出されることを明らかにした。霊長類モデルでは、経口および輸血感染系も作出されており、体液類の経時的解析も可能であることから、ヒトへの BSE 感染のリスク解明や生前・早期診断法の開発・評価に適していると考えられる。本研究では、PMCA による解析を経口投与サルや輸血サルに適用し、PrP^{Sc} の体内分布・動態を明らかにすることを目的とする。

非定型 BSE が霊長類に対して感染性を示し、その感染力は定型 BSE よりも強い可能性が示唆されている。したがって、畜産分野のみならず、食の安全性確保のためにも、定型 BSE のみならず、非定型 BSE 由来 PrP^{Sc} の高感度検出技術の開発が必要である。本研究では、非定型 BSE 感染サル由

来 PrP^{Sc} の超高感度検出法の開発も併せて行う。

B. 研究方法

1) 定型 BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の検出限界

PMCA 法による PrP^{Sc} の検出性を明らかにするため、定型 BSE 接種・発症サル (#007) の 10% 脳乳剤から 10 倍希釈系列を作製し、シードとして用いた。希釈段階サンプル毎に 8 本のチューブを用いて増幅した。増幅産物を新たに基質で 5 倍希釈し、再増幅を繰り返す連続 PMCA (7 ラウンド) を行った。各ラウンド毎の PMCA 産物を Proteinase K 消化後、ウェスタンブロット (WB) 法により PrP^{Sc} を検出した。

2) 経口投与・未発症カニクイザル

霊長類医科学研究センターで作出された定型 BSE 経口投与サル (#006) を解析した。BSE JP/6 (和歌山) 10% 脳乳剤をカテーテルにより胃内に投与した。投与後 7.5 年を経過しても、いかなる神経症状も観察されず、安楽死まで発症の兆候は認められなかった。解剖時に採材された各組織お

よび体液（血漿、血清、脳脊髄液および尿）を霊長類医科学研究センターより導入した。

3) 輸血・未発症サル

定型 BSE を脳内接種後、発症したカニクイザル（#007）の血液を輸血したサル（#013）の体液を解析した。このサルは発症の兆候は認められず、輸血後 5 年弱で安楽死させた。解剖時に採材された組織・体液を霊長類医科学研究センターより導入した。

4) サル組織における PrP^{Sc} 分布

各組織から 10% 乳剤を調製し、シードとして用いた。体液類は原液を、白血球分画は TritonX-100 可溶化液をシードとして用いた。サンプル毎に 8 本のチューブ（白血球は 3~4 本）を用いて増幅した。

5) 非定型 BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の増幅

非定型 BSE/JP24（佐世保）10% 脳乳剤を脳内接種後、発症したカニクイザル（#014）の脳組織を感染研より導入した。10% 脳乳剤の 10 倍希釈系列を作製し、PMCA シードとして用いた。定型 BSE 接種サル由来の PrP^{Sc} と増幅効率を比較した。

（倫理面への配慮）

BSE 感染サルは、霊長類医科学研究センターおよび国立感染症研究所において接種、飼育および安楽死等に関わる動物倫理面を考慮した上で適切に処置された。本研究で使用したサル組織・体液類は微生物等導入許可申請を経て、両研究機関から動物衛生研究所・プリオン病研究センターの BSL3 施設内に導入されたものである。

C. 研究結果

1) PMCA 法による PrP^{Sc} 検出限界

PMCA 増幅後、各ラウンド毎に WB で PrP^{Sc} を検出した結果を図 1 に示す。1 ラウンドの増幅では、 10^{-5} 希釈サンプルの陽性率は 100% (8/8)、 10^{-6} 希釈サンプルの陽性率は 50% (4/8) であった。2 ラウンドの増幅後、検出性は大きく向上し、 10^{-6} ~ 10^{-8} サンプルにおける陽性率は 100% (8/8) となり、 10^{-9} サンプルでも 87.5% (7/8) の陽性率を示した。3 ラウンドでは、 10^{-9} サンプルが 100% 陽性になるとともに、 10^{-10} サンプルでも陽性例が検出されるようになり、5 ラウンド以降、陽性率は 37.5% (3/8) であった。 10^{-11} サンプルでは 4 ラウンド以降、陽性例が検出されるようになり、6 ラウンド以降、陽性率は 25% (2/8) であった。 10^{-12}

サンプルでは 7 ラウンドの増幅でも PrP^{Sc} シグナルは検出されなかった。

2) 定型 BSE 経口投与サルにおける PrP^{Sc} 分布

定型 BSE 経口投与サル（#006）の 62 の組織・体液における PrP^{Sc} を連続 PMCA により解析した結果を表 1 に示す。これら組織・体液中、深頸リンパ節、延髄、脾臓、血漿、回腸から PrP^{Sc} を検出した。図 2 に PrP^{Sc} 陽性組織・体液の PMCA 産物の WB 解析結果を示す。図 1 に示した感染脳乳剤希釈サンプルの 7 ラウンド目の陽性率を基に各組織・体液に含まれる PrP^{Sc} 量を推定すると、脾臓および深頸リンパ節サンプルは 25% (2/8) が陽性となり、感染脳乳剤の 10^{-11} 希釈に相当する PrP^{Sc} を含んでいたと考えられる。また、延髄、血漿、回腸では、7 ラウンド目の陽性率が 1/8 であったことから、感染脳乳剤の 10^{-12} ~ 10^{-11} 希釈サンプルに相当する PrP^{Sc} を含んでいたと推定される。

3) 輸血サルの体液中の PrP^{Sc} 検出

発症カニクイザル（#007）の血液を輸血したサル（#013）から解剖時に血清、血漿、白血球および脳脊髄液を採取し、PMCA 用シードに用いて増幅したところ、いずれのサンプルからも PrP^{Sc} を検出しなかった。

4) 非定型 BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の増幅

定型 BSE 接種サル由来 PrP^{Sc} の至適増幅条件下では、非定型 BSE 感染サル（#014）由来 PrP^{Sc} はほとんど増幅されなかった。超音波発振条件を変更することによって増幅が可能となり、2 ラウンドの増幅で感染脳乳剤の 10^{-5} 希釈サンプルからシグナルが検出された。

D. 考察

本研究で用いた連続 PMCA 法では、感染サル脳乳剤の 10^{-12} ~ 10^{-11} 希釈サンプルに含まれる PrP^{Sc} 量まで検出可能であると考えられる。定型 BSE を経口投与後、7.5 年を経過して未発症であった #006 サルにおける PrP^{Sc} の体内分布を PMCA により網羅的に解析した結果、深頸リンパ節、延髄、脾臓、血漿、回腸から極微量の PrP^{Sc} を検出した。したがって、このサルは長期間無症候状態にあったが、感染は成立しており、特定のリンパ系組織を中心に PrP^{Sc} が蓄積しつつあったと考えられる。PrP^{Sc} の分布が限定的であったのにもかかわらず、延髄にも PrP^{Sc} が認められたことから、いずれ発症に至った可能性が高い。

齧歯類では、感染個体の白血球や血漿から PrP^{Sc}

が検出された例が報告されているが、ヒトを含む霊長類で未発症個体の血液から PrP^{Sc} が検出される事を示したのは本研究が初めてである。この結果は、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。PMCA 法では、通常シードを増幅基質で 10 倍に希釈して増幅を行うため、極微量 PrP^{Sc} を含むサンプルの場合、増幅開始時に検出限界以下にまで希釈してしまう事態が想定される。今後、増幅の前段階で血漿サンプル等に含まれる PrP^{Sc} を濃縮・精製し、検出性を高める工夫が必要であろう。

一方、輸血サル (#013) の体液類からは PrP^{Sc} は検出されなかった。輸血ドナーである#007 サルの死亡時に採取された白血球において、PrP^{Sc} は 5 ラウンド以降から検出され、7 ラウンド後の陽性率は 25%であった。したがって、ドナー白血球サンプル（血液約 1.5ml から分取）は感染脳乳剤のおおよそ 10⁻¹¹ 希釈に相当すると推定される。血液に含まれる PrP^{Sc} 量は極めて少なく、効果的に伝達される量とはいえない。また経過観察期間も 5 年弱と比較的短く、超高感度法を用いても検出は難しいと予想される。輸血サル (#013) の組織を用いた網羅的検索には、サンプルを濃縮する等、増幅前の前処理が有効かも知れない。

非定型 BSE 感染牛由来の PrP^{Sc} は、定型 BSE 感染牛由来 PrP^{Sc} の増幅条件下では増幅効率が低い。サルに継代後も同様な傾向が認められた。本年度は超音波照射条件の変更により、非定型 BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の増幅が可能になったが、増幅効率は低く、超高感度検出には至っていない。至適増幅条件の検討など、効率的増幅法の開発を継続する必要がある。

E. 結論

連続 PMCA 法により、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の深頸リンパ節、脾臓、延髄、血漿、回腸から PrP^{Sc} を検出した。この結果は血液を用いた早期診断の可能性を示唆している。非定型 BSE 感染サル由来の PrP^{Sc} の増幅効率は低く、至適増幅条件の検討など、増幅法の開発を継続する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshioka, M., Imamura, M., Okada, H., Shimozaki, N., Murayama, Y., Yokoyama, T. and Mohri, S. Sc237 hamster PrP^{Sc} and Sc237-derived mouse PrP^{Sc} generated by interspecies *in vitro* amplification exhibit distinct pathological and biochemical properties in tga20 transgenic mice. *Microbiol. Immunol.*, 55: 331–340, 2011
- 2) Fukuda, S., Onoe, S., Nikaido, S., Fujii, K., Kageyama, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Yoshioka, M., Murayama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. and Okada, H. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65: 37–44, 2012
- 3) Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Murayama, Y., Mohri, S. and Yokoyama, T. Detection of disease-associated prion protein in the posterior portion of the small intestine involving the continuous peyer's patch in cattle orally infected with bovine spongiform encephalopathy agent. *Transbound. Emerg. Dis.*, 58: 333–343, 2011

2. 学会発表

- 1) Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Imamura, M., Shimizu, Y., Murayama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. and Kitani, H. Brilliant blue G, an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 prevents prion accumulation. Prion2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 2) Nagaoka, K., Yoshioka, M., Shimozaki, N., Yamamura, T., Murayama, Y., Yokoyama, T. and Mohri, S. Sensitive detection of scrapie prion protein in soil. Prion2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 3) Tsutsumi, Y., Bang, H.J., Takata, E., Fukuda, A., Murayama, Y., Yoshioka, M., Noguchi, T. Inactivation of BSE prion and recycling of bovine meat and bone meal by sub-critical water treatment. Prion2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 4) Imamura, M., Kato, N., Yoshioka, M., Okada, H., Iwamaru, Y., Shimizu, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. and Murayama, Y. Brain-derived proteins are