

not necessary for reproductive propagation of prions by protein misfolding cyclic amplification using baculovirus-derived recombinant prion protein. Asian pacific prion symposium 2011 (July 10-11, 2011, Nagano, Japan)

- 5) Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Imamura, M., Shimizu, Y., Murayama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. and Kitani, H. Anti-prion activity of Brilliant blue G, an antagonisit of the ATP-sensitive receptor P2X7. Asian pacific prion symposium

2011 (July 10-11, 2011, Nagano, Japan)

- 6) 村山裕一、BSE 異常プリオン蛋白質の超高感度検出法の開発. 家畜衛生フォーラム 2011 (2011年11月25日、東京)

**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

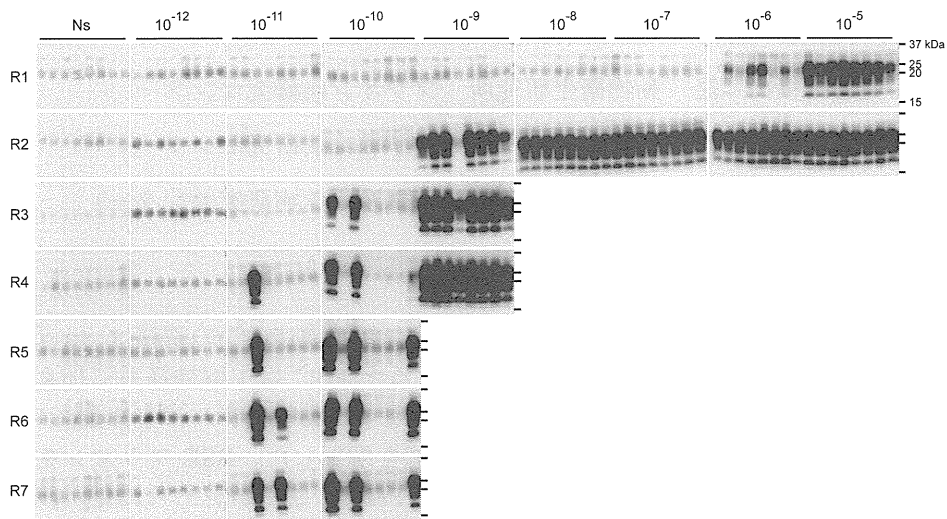


図 1. 定型 BSE 由来サル PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 増幅結果

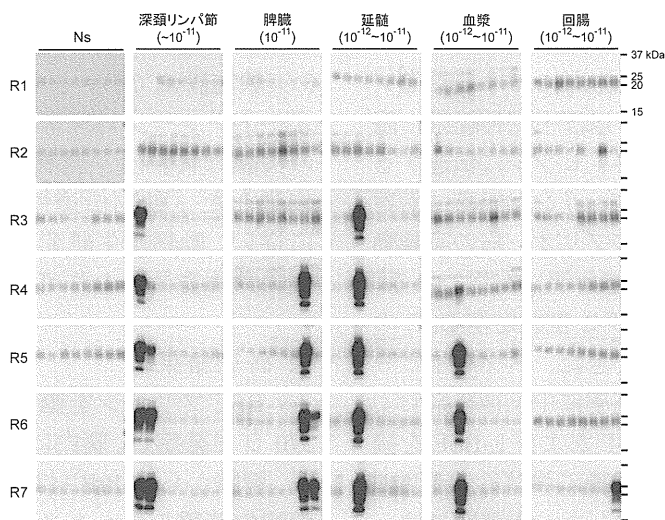


図 2. PrP<sup>Sc</sup> 陽性組織・体液における WB 解析結果

表 1. 経口接種・未発症サル (#006) における PrP<sup>Sc</sup> 検出結果

Tissue	PMCA	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Tissue	PMCA	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Tissue	PMCA	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Tissue	PMCA	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
腸間膜リンパ節	○							0/8	肝臓	○							0/8	十二指腸	○							脳脊髄液	○						0/8		
腸骨リンパ節	○							0/8	脾臓	●			1/8	1/8	2/8	2/8	0/8	空腸	○							血清	○						0/8		
鼠径リンパ節	○							0/8	腎臓	○							0/8	回腸	●						血漿	○			1/8	1/8	1/8	1/8	0/8		
深頸リンパ節	●			1/8	1/8	2/8	2/8	2/8	心臓	○							0/8	盲腸	○						白血球	○							0/3		
顎下リンパ節	○							0/8	肺	○							0/8	結腸	○						尿	○							0/8		
骨髄	○							0/8	食道	○							0/8	直腸	○						胸腺	○							0/8		
眼球	○							0/8	胃・噴門部	○							0/8	副腎	○						坐骨神経	○							0/8		
視神経	○							0/8	胃・幽門部	○							0/8	前頭葉皮質	○						腸間膜リンパ節	○							0/8		
三叉神経	○							0/8	脾臓	○							0/8	前頭葉皮質	○															0/8	
脊髄頸部	○							0/8	膀胱	○							0/8	頭頂葉皮質	○															0/8	
脊髄胸部	○							0/8	甲状腺	○							0/8	頭頂葉皮質	○															0/8	
脊髄腰部	○							0/8	精巣	○							0/8	後頭葉皮質	○															0/8	
脊髄頸部神経根+叢	○							0/8	顎下線	○							0/8	後頭葉皮質	○															0/8	
脊髄胸部神経根+叢	○							0/8	耳下線	○							0/8	海馬	○															0/8	
脊髄腰部神経根+叢	○							0/8	扁桃	○							0/8	小脳	○															0/8	
坐骨神経	○							0/8	肺門リンパ節	○							0/8	橋	○															0/8	
胸部交感神経	○							0/8	腋窩リンパ節	○							0/8	延髄	●			1/8	1/8	1/8	1/8									1/8	
腹部交感神経	○							0/8	回腸②	○							0/8	下垂体	○															0/8	

## 13. BSE 病態を反映する実験動物モデルの作出と評価

分担研究者 横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者 岡田洋之 (動物衛生研究所・プリオン病研究センター)

舩甚賢太郎 (動物衛生研究所・プリオン病研究センター)

### 研究要旨

牛海綿状脳症(BSE)罹患牛における異常プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の蓄積は、ほぼ中枢神経系に限局している。BSE を他の動物に伝達すると PrP<sup>Sc</sup> は中枢神経系に加えて、リンパ組織にも蓄積する。BSE 罹患牛の病態を再現する動物モデルは知られていない。ハムスターに BSE プリオンを接種し、その病態を解析した。BSE プリオンを脳内接種したハムスターは約 270 日で発症し、脳内に PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が認められたが、脾臓から PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。BSE プリオンを腹腔内接種したハムスターは 410 日で発症し、脳には高率に PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが、脾臓からの PrP<sup>Sc</sup> の検出は少数 (2/20) で、蓄積量も少量であった。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症(BSE)感染牛の体内における異常プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の蓄積は、ほぼ中枢神経系に限局している。BSE を他のマウス、ヒツジに伝達すると、PrP<sup>Sc</sup> は中枢神経系に加えて、リンパ組織にも蓄積が認められる。神経限局性のプリオン病の実験動物モデルの開発は、BSE の病態解明に有用である。これまでの研究で、BSE および L 型非定型 BSE の実験動物への伝達試験を行ってきた。スクレイピー感染ハムスターでは、PrP<sup>Sc</sup> が高率に中枢神経系およびリンパ組織に蓄積するが、BSE および L-BSE を接種したハムスターではリンパ組織における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が稀であることを明らかにした。本課題では、BSE プリオンを末梢から投与 (腹腔内接種および経口投与) した時のハムスターの病態を解析し、神経限局性の病態の再現の有無と、BSE 病態解析モデルとしての有用性を評価する。

### B. 研究方法

- 1) BSE および非定型 BSE をハムスターへ接種し、その感染効率、潜伏期、病態、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積などを検討する。
- 2) 臨床症状の有無、ウエスタンブロット、免疫組織化学的手法などによる PrP<sup>Sc</sup> の検出を行い、牛およびその他の実験動物との病態を比較する。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱いは動

物衛生研究所内のバイオセーフティレベル (BSL) 3 実験施設にて行い、汚染物は 135°C、30 分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は実験は、農林水産省技術会議事務局の作製した「動物伝達性海綿状脳症の実験指針」に従い、動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施した。

### C. 研究結果

1) BSE プリオンを脳内接種したハムスターは約 270 日で発症し、脳内に PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が認められたが、脾臓からは PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。また、腹腔内接種したハムスターは 410 日で発症し、脳には高率に PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが、脾臓での PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は少数例(2/20)で、陽性の場合でも極めて少量の蓄積であった。一方、スクレイピー-Sc237 株を接種したハムスターは脳内接種では約 63 日、腹腔内接種では 119 日で発症が認められた。BSE プリオンは、スクレイピーに比べて約 4 倍の潜伏期を示し (表 1)、脳及び脾臓から PrP<sup>Sc</sup> が高率に検出された。

2) Sc237 腹腔内接種ハムスターについて、経時的な観察を行った。接種 60 日後の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は、個体によって様々であり、PrP<sup>Sc</sup> の検出されない個体、脾臓のみ、副腎のみまたは脳のみで PrP<sup>Sc</sup> が蓄積した個体が認められた。しかし、接種 120 日後 (感染末期) の PrP<sup>Sc</sup> の分布は、すべての個体

で類似していた。

#### D. 考察

BSE プリオンを伝播したハムスターでは、スクレイピー株に比べて長い潜伏期で伝達が発生した。脾臓（リンパ組織）における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は低率で、中枢神経系に PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が限局する実験動物モデルの候補として期待される。

#### E. 結論

ハムスター馴化 BSE プリオンは脳内接種（267日）、腹腔内接種（410日）でハムスターに伝達した。Sc237 接種ハムスターでは脳および脾臓より高率に PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが、BSE 接種ハムスターは、発症したすべてのハムスターの脳内から PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが、脾臓の PrP<sup>Sc</sup> は低率（脳内接種では 0/15、腹腔内接種では 2/20）であった。脾臓で PrP<sup>Sc</sup> 陽性の個体でも、その蓄積量はわずかであった。

Sc237 腹腔内接種ハムスターの 60 日後の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は、個体によって様々であったが、感染末期の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は、すべての個体で類似していた。BSE プリオンのハムスターへの経口投与による伝達性は検討中である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G.. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Yokoyama T. Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies. Prion 5:2, 103-108,

2011.

- 2) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. Prion 6: 1-5, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) Hasegawa K., Mohri S., Yokoyama T. Comparison of the Structural Stability of Various Mammalian Cellular Prion Proteins Based on the Fragment Molecular Orbital Calculations. Prion 2011, (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 2) Yokoyama T, Kaku-Ushiki Y, Mohri S. PrP<sup>Sc</sup> heterogeneity in inter- and intra-species transmission. Prion 2011 (May, 17-19, 2011, Montreal, Canada)
- 3) Shu Y, Masujin K, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S, Yokoyama T, Characterization of Syrian hamster adapted prions derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies. APPS2011 (July 10-11, 2011, Karuizawa)

#### 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. BSE およびスクレイピープリオンを接種したハムスターの潜伏期と PrP<sup>Sc</sup> の蓄積

Inoculum	route	Diseased/ inoculated	Incubation period (days)	PrP <sup>Sc</sup> positive/ examined	
				Brain	spleen
C-BSE	ic	15/15	266.5 ± 17.9	15/15	0/15
	ip	20/22	410.8 ± 90.5	20/20	2/20
Sc237	ic	10/10	62.6 ± 1.5	5/5	10/10
	ip	9/9	118.8 ± 14.3	9/9	9/9

### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出 版 年	ページ
堀内基広	プリオン病		最新医学	最新医学社	大阪	2011	2713-2720
堀内基広	プリオンとプリオン病	見上彪監修	獣医微生物学(第3版)	文永堂出版	東京	2011	280-285
新竜一郎、佐藤克也	プリオン病の髄液診断の可能性	鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆	Annual Review 神経	中外医学社	東京	2011	121-129

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, 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
Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R. and Horiuchi, M.	Characterization of intracellular localization of PrPSc in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP	J. Gen. Virol.	93	668-680	2012
Hasebe, R., Raymond, G.J., Horiuchi, M., Caughey, B.	Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo	Virology	423	205-213	2012
Yoshikawa, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Kadohira, M., Kai, S., Mizusawa, H., Nagata, C., Onodera, T., Sata, T., Tsutsui, T., Yamada, M., Yamamoto, S.	Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan	J. Vet. Med. Sci.			in press
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
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
Atarashi, R., Sano, K., Satoh, K. and Nishida, N.	Real-time quaking-induced conversion: A highly sensitive assay for prion detection.	Prion	5(3)		in press
Matsui, Y., Satoh, K., Miyazaki, T., Shirabe, S., Atarashi, R., Mutsukura, K., Satoh, A., Kataoka, Y. and 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
Fujita, K., Harada, M., Sasaki, M., Yuasa, T., Sakai, K., Hamaguchi, T., Sanjo, N., Shiga, Y.,	Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for	BMJ Open	2	e000649	2012

Satoh, K., Atarashi, R., Shirabe, S., Nagata, K., Maeda, T., Murayama, S., Izumi, Y., Kaji, R., Yamada, M. and Mizusawa, H.	the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study.				
Kobayashi, A., Mizukoshi, K., Iwasaki, Y., Miyata, H., Yoshida, Y. and 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. and 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)	502-9	2011
Yokoyama, T., Takeuchi, A., Yamamoto, M., Kitamoto, T., Ironside, JW. and Morita, M.	Heparin enhances the cell-protein misfolding cyclic amplification efficiency of variant Creutzfeldt-Jakob disease.	Neurosci. Lett.	498 (2)	119-23	2011
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	9321-9328	2011
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
Honda, H., Sasaki, K., Minaki, H., Masui, K., Suzuki, SO., Doh-ura, K. and Iwaki T.	Protease-resistant PrP and PrP oligomers in the brain in human prion diseases after intraventricular pentosan polysulfate infusion.	Neuropathology		in press	2011
Unno, M., Shinohara, M., Takayama, K., Tanaka, H., Teruya, K., Doh-ura, K., Sakai, R., Sasaki, M. and 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
Nguyen, T., Sakasegawa, Y., Doh-ura, K. and 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



Ono, F., Tase, N., Kurosawa, A., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Terao, K. and Sata, T.	Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate.	Jpn. J. Infect. Dis.	64(1)	81-84	2011
Ono, F., Terao, K., Tase, N., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Kurosawa, A., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, K., Yamakawa, Y. and Sata, T.	Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to cynomolgus macaques, a non-human primate.	Jpn. J. Infect. Dis.	64(1)	50-54	2011
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
Fukuda, S., Okada, H., Arai, S., Yokoyama, T. and Mohri, S.	Neuropathological Changes in Auditory Brainstem Nuclei in Cattle with Experimentally Induced Bovine Spongiform Encephalopathy.	J.Comp.Pathol.	145	302-307	2011
Yoshioka, M., Imamura, M., Okada, H., Shimozaki, N., Murayama, Y., Yokoyama, T. and Mohri, S.	Sc237 hamster PrPSc and Sc237-derived mouse PrPSc generated by interspecies in vitro amplification exhibit distinct pathological and biochemical properties in tga20 transgenic mice.	Microbiol. Immunol.	55	331-340	2011
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
Shu, Y., Masujin, K., Okada, H., Iwamaru,	Characterization of Syrian hamster adapted prions	Prion	5	103-108	2011

Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Mohri, S. and Yokoyama, T.	derived from L-type and C-type bovine spongiform encephalopathies.				
Masujin, K., Miwa, R., Okada, H., Mohri, S. and Yokoyama, T.	Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions.	Prion	6	1-5	2012

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# プリオン病

堀内基広\*

## 要 旨

ウシ海綿状脳症 (BSE) およびその後の変異クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の発生は世界を不安に陥れたが、BSE に対する管理措置が有効に機能し、2010 年以降の発生数は世界全体を合計しても 100 例以下にまで減少し、社会的な関心も薄れている。プリオン病の1つである BSE を撲滅できる日は遠くない、しかし、ヒトおよび動物では BSE 以外のプリオン病は存在するとともに、プリオン病の病態機序は依然として未解明の要素が多く残されている。

## プリオン病

プリオン病はヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ヒツジのスクレイビーに代表される致死性の神経変性性疾患である。本病に罹患したヒトあるいは動物の中樞神経系組織の試料を実験動物に接種すると病気が伝達可能であることから、伝達性海綿状脳症 (TSE) とも呼ばれてきた。

ウシのプリオン病であるウシ海綿状脳症 (BSE) は、1980 年代半ばに英国で出現し大流行した。BSE は英国で出現後、欧州、北米およびアジアへ拡散した。1996 年、BSE がヒトに感染したことが原因と考えられる変異クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の存在が報告されてから、食生活を介してヒト

が BSE に罹患して死に至るといった恐怖のため、BSE は大きな社会問題となった。BSE および vCJD の出現によりプリオン病がたびたび報道されたため、世界的に認知度が増した。また、プリオン病が感染症であるとの認識も定着している。しかし病原体「プリオン」は、自然状態での水平伝播による感染という点では、伝播力の非常に弱い病原体である。

プリオン病はその原因により、感染性、遺伝性、特発性 (原因不明) の3種に分類される (表1)。動物のプリオン病は、自然状態あるいは人為的な感染によるかは別にして、プリオンの感染が原因の感染症と考えられる。ヒトのプリオン病は感染性、遺伝性、および特発性の3種がある。このうち、特発性に分類される孤発性 CJD が 85% を占める。

感染症としてのヒトプリオン病には、クールー、医原性 CJD、および vCJD がある。vCJD は、BSE がヒトに感染した結果発生した新興感染症である。英国での vCJD の

\* 北海道大学大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室 教授

キーワード：プリオン病、ウシ海綿状脳症 (BSE)、クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレイビー

表1 プリオン病 (伝達性海綿状脳症)

動物のプリオン病	動物種	原因など
スクレイビー	ヒツジ, ヤギ	自然状態で感染
慢性消耗病 (CWD)	シカ, エルク	自然状態で感染
ウシ海綿状脳症 (BSE)	ウシ	汚染飼料の給餌
伝達性ミンク脳症 (TME)	ミンク	汚染飼料の給餌
ネコ海綿状脳症 (FSE)	ネコ科動物	汚染飼料の給餌
ヒトのプリオン病		原因など
クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)		
孤発性 CJD	特発性	偶発的 (宿命)
家族性 CJD	遺伝性	PrP 遺伝子の変異
医原性 CJD	感染性	汚染硬膜移植など
変異 CJD	感染性	BSE
ゲルストマン・ストロイスラー症候群	遺伝性	PrP 遺伝子の変異
致死性家族性不眠症	遺伝性	PrP 遺伝子の変異
クールー	感染性	宗教的食人儀式

発生は1つのピークを過ぎた (図1, 表2), しかし, これらの患者は PrP のコドン 129 が Met/Met のホモであり, vCJD に感受性が高い集団と考えられる. 今後 PrP コドン 129 が Met/Val, あるいは Val/Val を持つヒトで vCJD が発生するかどうか, 経過を注視する必要がある. また, vCJD は輸血によりヒトからヒトに伝播する. これまで, 4例の輸血症例 (3人は vCJD を発病, 1人は他の疾患で死亡後にリンパ系組織で異常型プリオンタンパク質 PrP<sup>Sc</sup> 陽性であることが判明) が報告されている.

我が国で発生したプリオン汚染脳硬膜の使用による医原性 CJD の症例は 140 例を超えた. 当該脳硬膜が使用されていたのは 1991 年までである. それから 20 年以上を経過した今日, 発生は非常に少ない. パプアニューギニアのフォア族で発生していたクールーは宗教的な食人儀式の廃止によって発生は減少したが, 潜伏期は長い例で 50 年を超える<sup>1)</sup>. ヒトの感染性プリオン病の発生の歴史は, 感染源あるいは感染経路を遮断することで病気

を根絶できることを示している. しかし, 潜伏期が長いことから長期的な対策が必要である.

#### BSE の発生とその対策

BSE も新興感染症であり, 1985 年頃から英国に存在していたと考えられている. BSE の由来として, ヒツジのスクレイビーが原因であるとする説と, 元来まれではあるがウシに存在していた病気であったとする説の 2 説がある. 病原体プリオンは病原体特異的な核酸ゲノムを持たないことから, 分子遺伝学的手法を用いて由来を推定することは不可能である.

BSE の大流行は, 斃死獣を処理して肉骨粉を生産するレンダリング工程の変更に起因する. 英国では 1980~83 年にレンダリング工程が変わった. 従来のバッチ法ではプリオンは完全に不活化されていたと考えられるが, バッチ法に取って代わった連続法では, プリオンが完全に不活化されずに最終産物である肉骨粉に残存した. 英国では肉骨粉を代用乳

図1 英国におけるウシ海綿状脳症（BSE）と変異クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）の発生状況

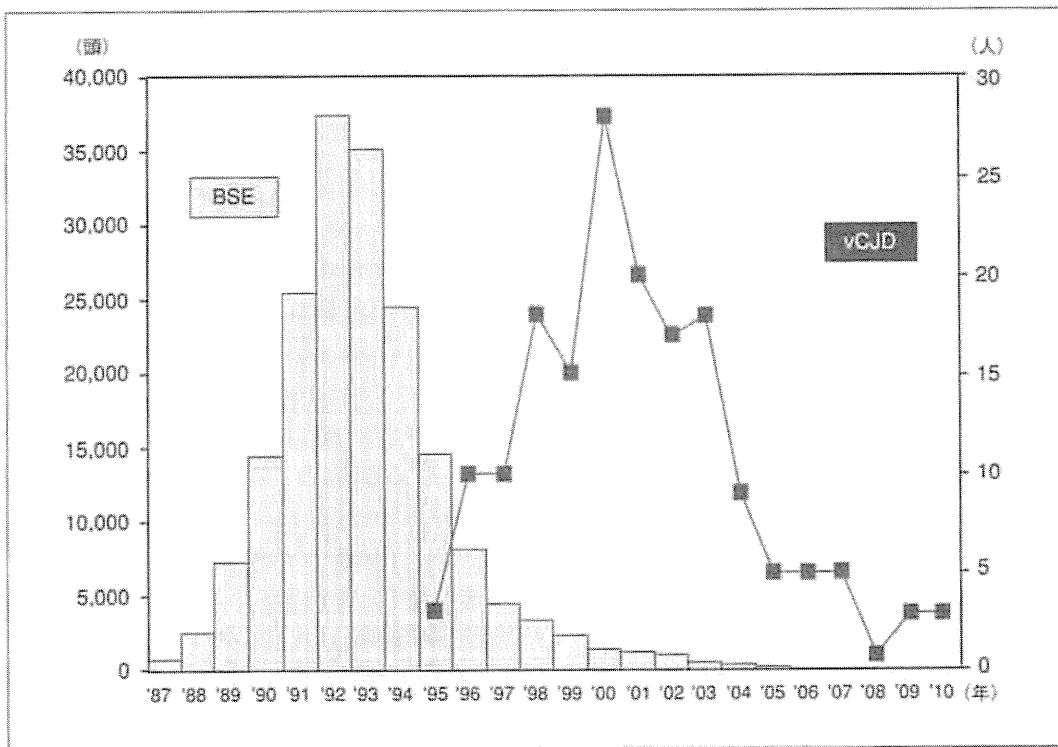


表2 ウシ海綿状脳症（BSE）の国別発生状況

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
英国	4,393	3,235	2,301	1,443	1,202	1,144	612	343	225	114	67	37	12	11
アイルランド	80	83	91	149	246	333	183	126	69	41	25	23	9	2
スイス	38	14	50	33	42	24	21	3	3	5	0	0	0	0
ポルトガル	30	127	159	149	110	86	133	92	46	33	14	18	8	6
フランス	6	18	31	161	274	239	137	54	31	8	9	8	10	5
ドイツ	2	0	0	7	125	106	54	65	32	16	4	2	2	0
スペイン	0	0	0	2	82	127	167	137	98	68	36	25	18	13
ポーランド	0	0	0	0	0	4	5	11	19	10	9	5	4	2
チェコ	0	0	0	0	2	2	4	7	8	3	2	0	2	0
スロバキア	0	0	0	0	5	6	2	7	3	0	1	0	0	1
日本	0	0	0	0	3	2	4	5	7	10	3	1	1	0
イスラエル	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
カナダ	0	0	0	0	0	0	2	1	1	5	3	4	1	1
米国	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0

あるいは人工乳に添加して仔牛に与えていたため、BSEの感染が拡大した。

英国では、BSEの存在が確認されて間も

ない1988年に、疫学的に肉骨粉がBSEの原因であることを突き止め、反芻動物由来の肉骨粉を反芻動物に給餌することを禁止した

表3 変異クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の国別発生状況  
英国のヒトプリオン病の発生状況

	英国のヒトプリオン病の発生状況				その他の国の vCJD	
	孤発性 CJD	変異型 CJD	医原性 CJD	遺伝性プリオン病		
1995	35	3	4	5	フランス	25
1996	40	10	4	6	アイルランド	4
1997	60	10	6	5	イタリア	2
1998	63	18	3	5	米国	3
1999	62	15	6	2	カナダ	1
2000	50	28	1	3	オランダ	2
2001	58	20	4	5	日本	1
2002	72	17	0	5	スペイン	5
2003	79	18	5	6	ポルトガル	2
2004	50	9	2	5	サウジアラビア	1
2005	66	5	3	13	台湾	1
2006	69	5	1	9		
2007	64	5	2	10		
2008	88	1	5	5		
2009	78	3	2	8		
2010	81	3	3	4		
2011	26	1 (4)	0	2		

カッコ内は存命の患者数

表4 我が国で実施されたウシ海綿状脳症 (BSE) 管理措置

< 出口管理 (BSE を食物連鎖から排除) >	
食用に供されるウシの BSE スクリーニング	当初は全月齢, 2005 年 8 月以降は 21 ヶ月齢以上を対象
特定危険部位の排除	頭部, 脊髄, 脊柱, 回腸遠位部 (全月齢)
< 入口管理 (BSE 感染源および感染経路の遮断) >	
飼料規制	当初は動物 → 動物の禁止, 現在は動物 → ウシの禁止
死亡牛の BSE サーベイランス	24 ヶ月齢以上
< 出生・育成履歴の証明 >	
トレーサビリティ制度	耳標の装着 (10 桁の個体識別番号)

(ruminant feed ban). これが功を奏して, 1992~93 年をピークに BSE 摘発数は減少した (図 1, 表 3). 平均潜伏期が 4~8 年と長いので, 効果が現れるまでに時間を要したのである. 1994 年には, 故意あるいは過失による肉骨粉のウシへの給餌を防止するため, 動物由来の肉骨粉を反芻動物に使用することを禁止した (animal feed ban). また 1996 年の vCJD の報告を受け, すべての動物に

動物由来の肉骨粉の使用を禁止した (complete feed ban). 1996 年の complete feed ban の導入以降に生まれたウシから 160 頭の BSE 牛が摘発されているが, ruminant feed ban が BSE 発生数の減少に大きく寄与したことは明らかである.

我が国では 2001 年 9 月に BSE の摘発を受け, 表 4 に示した対策を導入した. BSE が食を介してヒトに伝播することを防止する

ための緊急措置として、食用に供されるウシ全頭を対象とした BSE スクリーニング検査と特定危険部位 (BSE 病原体が蓄積することが知られている組織) の除去を柱とした対策を導入した。この 2 つは、BSE 病原体のヒトへの感染防止を目的とした出口側の管理措置である。一方、BSE がウシ間で拡大することを阻止する目的で、飼料規制と死亡牛の BSE サーベイランスを導入した。これらは、BSE の清浄化を目指すための入り口側の管理措置である。また、出生・育成履歴を明らかにするためのトレーサビリティ制度も導入した。臨床症状から BSE を診断することは難しいことから、BSE の汚染状況の正確な把握には、PrP<sup>Sc</sup> の検出によるアクティブサーベイランスが必要である。また、アクティブサーベイランスは飼料規制などの管理措置の有効性を検証する唯一の手段である。我が国で実施している BSE スクリーニング検査と死亡牛の BSE サーベイランスは、2002 年 1 月以降に生まれたウシで BSE に罹患したウシが存在しないことを明らかにした。したがって、BSE 発生に伴って導入された飼料規制は適切に遵守され、汚染飼料による BSE の感染拡大を防止できたことが証明された。

国際獣疫事務局 (OIE) の BSE ステータス評価に準拠すると、このままの状態が維持できれば日本は 2013 年に BSE 清浄国と同等のレベルになる。日本は国際的に見て非常に厳しい BSE 管理措置を維持してきた。管理措置の有効性および BSE の発生状況を踏まえて、将来展望を明確にしたロードマップを示しつつ、市民およびステークホルダーを交えたりスクコミュニケーションを活用しながら、管理措置の在り方について検討する必要がある。

### 非定型 BSE の存在

欧州および日本で実施された BSE のアクティブサーベイランスは、新たな懸念を見いだす結果ともなった。元来、世界で発生していた BSE は英国由来であり、BSE 病原体の生物学的および生化学的性状が同一であることから、同じ病原体がウシや飼料の輸出に伴って世界中に広まったと考えられていた。しかしアクティブサーベイランスは、従来の BSE (定型 BSE) とは異なるタイプの BSE である非定型 BSE の存在を明らかにした。最初にイタリアで発見されたが<sup>2)</sup>、その後、アクティブサーベイランスを実施しているほとんどの国で非定型 BSE が発見されるようになった<sup>3)</sup>。

非定型 BSE には、L-BSE と H-BSE がある。これは、イムノブロットで検出される PrP<sup>Sc</sup> の分子量が、定型 BSE と比較して小さい (L-BSE)、あるいは大きい (H-BSE) ことに由来する。非定型 BSE は 8 歳以上の高齢のウシで見つかることがほとんどである。フランスでの出生コホートの比較では、定型 BSE は 1996 年前後生まれのウシに集中しているのに対し、非定型 BSE の出生年から特定の原因を見いだすことはできない<sup>4)</sup>。非定型 BSE は高齢のウシで散発的に発見されることから、ヒトの孤発性 CJD のように感染や遺伝子の変異とは関係ない孤発性 BSE である可能性も考えられる。しかし、例数が少ないので今後のデータの蓄積を待つ必要がある。L-BSE は各種動物への伝達試験の成績も明らかになっている。ウシやウシ PrP を発現するトランスジェニックマウスへ接種した場合、定型 BSE よりも短い潜伏期で発病する。サルへの感染実験、あるいはヒト PrP を発現するトランスジェニックマウスへ接種した場合も、定型 BSE よりも短い潜伏期で発病する。したがって、非定型 BSE



はヒトへの感染性を有すると考えられる。仮に、非定型 BSE が一定の頻度で自然発生する孤発性 BSE であるとする、BSE の根絶は困難である。また、非定型 BSE でも定型 BSE と同様に、蓄積量は非常に低い但未梢神経からも PrP<sup>Sc</sup> が検出される<sup>9)</sup>。しかし、高齢のウシで発見される、発生頻度が 1/10<sup>7</sup> 程度と予想されるまれな疾患である。したがって、ウシ由来飼料の使用規制、一定の年齢以上のウシの特定部位の排除、および一定の年齢以上のウシの BSE スクリーニング/サーベイランスなどの継続により、非定型 BSE が新たな BSE 発生の原因となる可能性、およびヒトへの感染のリスクは十分に排除できると考えられる。

#### 高感度プリオン検出法

プリオン病の確定診断法として汎用される方法は、ELISA、イムノブロットあるいは免疫組織化学による PrP<sup>Sc</sup> の検出である。抗 PrP 抗体を用いて PrP<sup>Sc</sup> を検出するこれらの方法は、数時間から 1 日以内に結果が得られる。一方、被検材料を動物に接種してプリオンの存在を調べるバイオアッセイはこれらの方法よりも感度が高いが、その実施には年単位の期間を要するので実用的ではない。そのため、バイオアッセイと同程度以上の感度を有し、かつ短期間で結果が得られるプリオン検出法が求められてきた。

21 世紀に入ったこの 10 年間で、プリオン検出に大きな技術革新があった。PrP<sup>Sc</sup> を増幅して検出する protein misfolding cycling amplification (PMCA) 法の確立と、PrP<sup>Sc</sup> のアミロイド様の伸張反応を検出する quaking-induced conversion (QUIC) 法の確立である。両者とも試験管内で、PrP<sup>Sc</sup> 存在下で正常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) を PK 抵抗性の PrP 分子 (PrP-res) に転換する *in vitro* conversion reaction をもとにしてい

る<sup>10)</sup>。

PMCA は PrP<sup>C</sup> の供給源として脳乳剤を用い、試料中に含まれる PrP<sup>Sc</sup> を超音波処理とインキュベーションを繰り返しながら増幅する<sup>11)</sup>。反応後の試料からイムノブロットにより PrP-res を検出し、PrP<sup>Sc</sup> の有無を判定する。プリオン株と対象の動物によって効率は異なるが、1 回の PMCA で 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> 程度の増幅が可能である。さらにこの方法は、1 回目の PMCA 産物を新たな脳乳剤と混和して 2 回目の PMCA を行い、さらにこれを繰り返すことで、プリオン株に制約はあるものの PrP<sup>Sc</sup> の無限増幅が可能である。したがって PCR による遺伝子増幅と同様に、PMCA を繰り返すことで微量の PrP<sup>Sc</sup> を増幅して検出できることから検出感度は非常に高くなり、バイオアッセイをはるかに上回る検出感度が得られる<sup>12)</sup>。この方法は、組織中の微量プリオンの検出、プリオンの不活化の検証などに応用されている。1 回の PMCA の実施には 2 日程度を要し、これを繰り返す連続 PMCA ではさらに時間を要することから、迅速診断法への応用には限界がある。しかし、血液、薬粧品原料のスクリーニングなど、微量のプリオンの存在を試験する最も有力な方法として期待されている<sup>13)</sup>。

QUIC 法は、組み換え PrP (rPrP) が PrP<sup>Sc</sup> を seed としてアミロイド様の凝集体を形成する性質を利用して、被検試料中の PrP<sup>Sc</sup> を検出する方法である。形成される凝集体は PK 抵抗性の PrP-res であるが、凝集体の検出をチオフラビンなどアミロイド結合性の蛍光色素でモニターすることで、リアルタイムに測定可能である。この方法は、髄液を材料としたヒトプリオン病の診断に応用可能である<sup>14)</sup>。また 2 日間の反応で結果が得られるが、バイオアッセイと同等以上の感度を有することから、バイオアッセイに代わるプリオン感染価定量法として応用可能である<sup>15)</sup>。

プリオンは宿主タンパク質 PrP<sup>C</sup> から  
構成される感染粒子か？

—プリオン仮説の最終証明—

プリオン病研究の大きな課題の1つは、「プリオンは本当に宿主タンパク質 PrP<sup>C</sup> から構成されるか？」という命題を解くことである。Prusiner 博士が唱えた「プリオン仮説」によると、プリオンの主要構成要素は PrP<sup>C</sup> の構造異性体である PrP<sup>Sc</sup> であり、病原体特異的な核酸（ゲノム）は存在しない。ヒトおよび動物の *PrP* 遺伝子は、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）結合型膜糖タンパク質である PrP<sup>C</sup> をコードする。PrP<sup>Sc</sup> は PrP<sup>C</sup> から構造転換を含む何らかの翻訳後修飾によって産生されることから、PrP<sup>Sc</sup> も *PrP* 遺伝子の産物である。つまり、病原体は宿主遺伝子 *PrP* にコードされるタンパク質という解釈となる。プリオンの感染性を指標に精製した画分に PrP<sup>Sc</sup> が存在すること、精製した PrP<sup>Sc</sup> は感染性を有すること、PrP<sup>Sc</sup> がプリオンに感染した動物の中樞神経系やリンパ系組織、あるいはプリオン持続感染細胞から検出されること、PrP<sup>Sc</sup> の消失と感染性の消失がある程度一致することなど、PrP<sup>Sc</sup> がプリオンの構成要素であることを示す事実は数多くある。一方で、感染性のない PrP<sup>C</sup> や大腸菌などで産生された rPrP から感染性を有するプリオンを作出できれば、プリオン仮説は証明できる。

2004年に Legname らは、大腸菌で産生した rMoPrP(89-230)（成熟型 PrP<sup>C</sup> と比較して 23~88 番目までのアミノ酸を欠損する）を  $\beta$  シート化した後、同じ MoPrP を過発現するトランスジェニックマウス（Tg9949）に接種すると、7 匹中 5 匹が接種後 530 日までに発病し、さらに同じトランスジェニックマウスで連続継代すると潜伏期が短縮することを報告した<sup>12)</sup>。rMoPrP(89-230) から伝

達性を有するプリオンが産生されたことを意味する。しかし、欠損を持たない PrP<sup>C</sup> から野生型動物への伝達性を証明する必要があるとの論調があった。

プリオンの高感度検出法の項で紹介した PMCA は、プリオン仮説の検証に大きく貢献することとなった。連続 PMCA により、最初の反応に加えたプリオンは無視できるレベルにまで希釈される。最初の反応に加えたハムスター 263K 株感染脳が 10<sup>20</sup> に希釈された場合でも（最初に加えた感染脳中の感染価は完全に希釈排除される）、PrP-res を含む PMCA 産物に感染性があることから、PMCA で *de novo* に産生された PrP-res に感染性が付随することが示された<sup>13)</sup>。PMCA の原法では、PrP<sup>C</sup> の供給源として非感染動物の脳乳剤を使用する。しかし、脳乳剤中に PrP<sup>C</sup> 以外のプリオン構成要素が存在するという解釈は否定できない。そこで、精製された PrP<sup>C</sup> あるいは rPrP から、プリオンを加えないで *de novo* にプリオンが産生できるかが次の焦点となった。

RNA 分子は *in vitro* で rPrP から PrP-res への変換を助長する。ハムスター脳から PrP<sup>C</sup> を高度に精製した画分（他の高分子として炭素鎖 20 の脂肪酸が精製画分中に存在）に RNA を加えて PMCA を行うことで、ハムスターに伝達可能なプリオンが産生されることが報告され<sup>14)</sup>。また、大腸菌で産生・精製した rMoPrP に RNA と合成リン脂質を加えて連続 PMCA を行い、産生された PrP-res が野生型マウスに効率良くプリオン病を生じさせることが報告された<sup>15)</sup>。RNA も脂質も特定の宿主などに由来するのではなく、*de novo* のプリオン産生が生じることから、これらの分子がプリオン産生の補因子として機能するとしても、プリオンの感染性の本体は PrP 分子が担うことが証明されたことになる。

## おわりに

定型 BSE は、適切な管理措置によって制圧に向かっている。BSE がヒトに感染した結果生じた vCJD も、ウシ→ヒト、および輸血によるヒト→ヒトの経路を遮断することで、感染拡大は阻止できる。一方で、非定型 BSE のような新たなプリオン病の存在が明らかとなっている。仮に vCJD は制圧できたとしても、遺伝性プリオン病や孤発性 CJD は人類が存続する以上常に発生する疾患であり、診断法の向上および治療法の開発が必要である。また、ヒツジのスクレイビーやシカ科動物の慢性消耗病など、制圧が困難な動物プリオン病が依然として存在する。BSE の脅威と不安は去りつつあるが、今後も研究の継続は必須である。

## 文 献

- 1) Collinge J, et al: A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363 (1510): 3725-3739, 2008.
- 2) Casalone C, et al: Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (9): 3065-3070, 2004
- 3) Seuberlich T, et al: Atypical transmissible spongiform encephalopathies in ruminants: a challenge for disease surveillance and control. *J Vet Diagn Invest* 22 (6): 823-842, 2010.
- 4) Baron T: *NeuroPrion News*, No.9, 2008.
- 5) Iwamaru Y, et al: Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. *Emerg Infect Dis* 16 (7): 1151-1154, 2010.
- 6) Kocisko DA, et al: Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370 (6489): 471-474, 1994.
- 7) Saborio GP, et al: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411 (6839): 810-813, 2001.
- 8) Castilla J, et al: *In vitro* generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121 (2): 195-206, 2005.
- 9) Castilla J, et al: Detection of prions in blood. *Nat Med* 11 (9): 982-985, 2005.
- 10) Atarashi R, et al: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17 (2): 175-178, 2011.
- 11) Wilham JM, et al: Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* 6 (12): e1001217, 2010.
- 12) Legname G, et al: Synthetic mammalian prions. *Science* 305 (5684): 673-676, 2004.
- 13) Deleault NR, et al: Formation of native prions from minimal components *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (23): 9741-9746, 2007.
- 14) Wang F, et al: Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327 (5969): 1132-1135, 2010.

## Prion Diseases

Motohiro Horiuchi

Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine,  
Hokkaido University

## Characterization of intracellular localization of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119–127 of mouse PrP

Takeshi Yamasaki,<sup>1</sup> Akio Suzuki,<sup>1</sup> Takeshi Shimizu,<sup>2</sup> Masahisa Watarai,<sup>3</sup> Rie Hasebe<sup>1</sup> and Motohiro Horiuchi<sup>1</sup>

Correspondence  
Motohiro Horiuchi  
horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

<sup>1</sup>Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan

<sup>2</sup>Department of Molecular Infectiology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chiba 260-8670, Japan

<sup>3</sup>Department of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

Generation of an abnormal isoform of the prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) is a key aspect of the propagation of prions. Elucidation of the intracellular localization of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells facilitates the understanding of the cellular mechanism of prion propagation. However, technical improvement in PrP<sup>Sc</sup>-specific detection is required for precise analysis. Here, we show that the mAb 132, which recognizes the region adjacent to the most amyloidogenic region of PrP, is useful for PrP<sup>Sc</sup>-specific detection by immunofluorescence assay in cells pre-treated with guanidine thiocyanate. Extensive analysis of the intracellular localization of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells using mAb 132 revealed the presence of PrP<sup>Sc</sup> throughout endocytic compartments. In particular, some of the granular PrP<sup>Sc</sup> signals that were clustered at peri-nuclear regions appeared to be localized in an endocytic recycling compartment through which exogenously loaded transferrin, shiga and cholera toxin B subunits were transported. The granular PrP<sup>Sc</sup> signals at peri-nuclear regions were dispersed to the peripheral regions including the plasma membrane during incubation at 20 °C, at which temperature transport from the plasma membrane to peri-nuclear regions was impaired. Conversely, dispersed PrP<sup>Sc</sup> signals appeared to return to peri-nuclear regions within 30 min during subsequent incubation at 37 °C, following which PrP<sup>Sc</sup> at peri-nuclear regions appeared to redisperse again to peripheral regions over the next 30 min incubation. These results suggest that PrP<sup>Sc</sup> is dynamically transported along with the membrane trafficking machinery of cells and that at least some PrP<sup>Sc</sup> circulates between peri-nuclear and peripheral regions including the plasma membrane via an endocytic recycling pathway.

Received 8 August 2011  
Accepted 10 November 2011

### INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative disorders characterized by neuronal vacuolization, astrocytosis and accumulation of an abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the central nervous system. PrP<sup>Sc</sup> is considered to be a major component of prions, the causative agent of TSE. PrP<sup>Sc</sup> is a  $\beta$ -sheet-rich structural isomer of a cellular isoform of the prion protein (PrP<sup>C</sup>) and is generated from PrP<sup>C</sup> that is encoded by the *Prnp* gene of the host cell (Prusiner, 1998). Infectivity of prions is thought to be associated with PrP<sup>Sc</sup> oligomers (Silveira *et al.*, 2005); therefore, generation of PrP<sup>Sc</sup> is a key aspect of prion propagation.

To elucidate the cell biological mechanism of prion propagation, the biosynthesis of PrP<sup>C</sup> and the generation

of PrP<sup>Sc</sup> have been investigated using cultured cells susceptible to prion infection. A number of biochemical and cell biological analyses have contributed to elucidation of the intracellular dynamics of PrP<sup>C</sup> (Campana *et al.*, 2005). In contrast to the biosynthesis of PrP<sup>C</sup>, the mechanisms by which PrP<sup>Sc</sup> is generated in prion-infected cells are not yet fully understood. One of the obstacles to cell biological analyses of PrP<sup>Sc</sup> is the difficulty in the specific detection of PrP<sup>Sc</sup>. Since PrP<sup>Sc</sup> and PrP<sup>C</sup> have the same primary structure, most of the antibodies against the PrP molecule cannot distinguish PrP<sup>Sc</sup> from PrP<sup>C</sup>. Although some antibodies can specifically immunoprecipitate PrP<sup>Sc</sup> (Horiuchi *et al.*, 2009; Korth *et al.*, 1997; Paramithiotis *et al.*, 2003), these antibodies are not suitable for the detection of PrP<sup>Sc</sup> by immunocytochemical analysis. Taraboulos *et al.* (1990) reported that pre-treatment of fixed cells with