

7. プリオンの細胞および組織における病理学的研究

分担研究者 飛梅 実 (国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官)
研究協力者 佐藤 由子 (国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官)
佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所・所長)

研究要旨

本研究では、中間径フィラメントである宿主因子 *peripherin* の *in vitro* でのプリオン感染にあたる分子機序について検討した。これまでの研究において *peripherin* はマウスでのプリオン病病態の進行を促進することを明らかにしてきた。*Peripherin* はその存在自体ではプリオンの異常型への置換を誘導しない。しかしながら、今回の研究から、プリオンの細胞内への侵入に伴い、局在の変化が誘導されることが明らかとなった。通常では核周囲から細胞突起へと延びる繊維状の配列を示すが、プリオンの存在により核周囲で凝集塊を形成した。この凝集塊中には取り込まれたプリオンが存在した。また、プリオンの細胞内への侵入に伴い、リン酸化された 1%triton X-100 可溶性の *peripherin* は減少した。このことはプリオンの細胞内への侵入により *peripherin* が脱リン酸化され細胞内局在の再構成が誘導されることを示唆する。また、可溶性 *peripherin* 量は細胞内へのプリオンの侵入量を制御している可能性が示唆された。これらの結果は、プリオンの細胞への侵入、蓄積といった生活環に *peripherin* をはじめとする中間径フィラメントが関与することを示唆する。今後、*peripherin* の脱リン酸化を誘導する因子の検索等を行い、プリオンの細胞内への侵入後の生活環に関与する宿主因子の分子機序を探索する。

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、プリオンの宿主主体内、細胞内での生活環解明に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

これまでの研究において宿主因子 *peripherin* はマウスでのプリオン病態の進行を促進することを明らかにしてきた。本研究では *peripherin* のプリオン感染過程における挙動と感染成立に与える影響について検討した。

1) プリオン感染細胞および脳組織破砕液添加による N2a 細胞中の *peripherin* 量の変動

BSE 由来プリオン感染マウス脳、スクレイピー感染マウス脳およびプリオン持続感染細胞 ScN2a 細胞の破砕液(脳破砕液は 2%脳乳剤、ScN2a

細胞は 1×10^6 cells/ml) をマウス神経芽細胞腫 N2a 細胞培養液中に添加し、その後の N2a 細胞中の *peripherin* の増減についてウエスタンブロットを用いて検討した(図 1)。また、添加破砕液の量と添加後の時間との関係について検討した(図 2)。

2) *peripherin* 減少を誘導する ScN2a 細胞由来因子の検討

N2a 細胞中の *peripherin* の減少を誘導する因子がプリオン感染により誘導される因子によるものか、またはプリオンそのものによるかについて検討した。ScN2a 細胞破砕液を超速心によりプリオンを含む沈殿画分と上清画分に分け、N2a 細胞に添加しその後の *peripherin* の増減についてウエスタンブロットにより解析した(図 3)。

3) プリオン添加による *peripherin* の生化学的性状の変化の解析

プリオン添加により減少する N2a 細胞中の

peripherin 量が絶対量の変化に由来するか否かについて細胞破碎液調整用溶液の界面活性剤の種類を変え検討した (図 4)。

また、プリオン添加により減少が誘導される tritonX-100 可溶性 peripherin の生化学的性状を解析するため、免疫沈降法を用いて peripherin を検出しその生化学的性状について検討した (図 5)。

4) peripherin 過剰発現による prion の細胞内への侵入量の変化

Peripherin 存在下での prion の挙動について検討するため、peripherin 発現量の多い N2a-5 細胞および低発現量の N2a-1 細胞を用いて、細胞内へ取り込まれる prion 量について検討した (図 6)。

5) プリオン添加後の細胞内 peripherin と prion の局在について蛍光免疫染色法を用いて検討した (図 7)。

6) prion 感染非感受性であり peripherin 非発現細胞である 293T 細胞へ peripherin を強制発現させ、プリオン添加後の peripherin 量の変化について検討した (図 8)。

(倫理面への配慮)

プリオンのマウスへの感染実験においては、国立感染症研究所・動物実験委員会規定の指針に沿い、動物実験計画書を提出・承認後に行った。また、トランスフェクション等に使用する発現ベクター等の構築は国立感染症研究所組み換え DNA 実験指針に沿い、計画書申請を行い承認を得ている。

C. 研究結果

1) プリオン感染細胞および脳組織破碎液添加による N2a 細胞中の peripherin 量の変動

N2a 細胞培養液中へ BSE 由来プリオン感染マウス脳、スクレイピー感染マウス脳およびプリオン持続感染細胞 ScN2a 細胞の破碎液 (脳破碎液は 2% 脳乳剤を 50ul/ well(6well plate)、ScN2a 細胞は 50ul/ well(1×10^6 cells/ml) を添加し 36 時間後に PBS で洗浄後、1% Triton X-100 を含む細胞溶解液で細胞を溶解した。溶解液を 2500r.p.m. 10 分遠心し上清をウエスタンブロットの試料とした。SDS-page

展開後、抗 peripherin 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。同時に peripherin 同様中間径フィラメントである GFAP およびインターナルコントロールとして GAPDH を検出した (図 1)。その結果、プリオン非感染脳乳剤添加群に比べ、prion 感染マウス脳乳剤および培養細胞破碎液添加群では peripherin 量の低下が認められた。また、peripherin 同様に中間径フィラメントである GFAP も減少した。プリオン持続感染細胞 ScN2a 細胞破碎液を用いた実験から、N2a 細胞中の peripherin 量は添加する ScN2a 細胞破碎液量依存的および時間依存的に減少することが明らかとなった (図 2)。

2) peripherin 減少を誘導する ScN2a 細胞由来因子の検討

N2a 細胞中の peripherin 減少を誘導する因子が prion 感染に伴い産生される因子か、プリオンそのものかについて検討するため、ScN2a 細胞破碎液を遠心を用いて、プリオンを含む沈殿画分およびプリオンを含まない上清画分に分け、N2a 細胞中の peripherin 減少能について検討した。その結果、プリオンを含む沈殿画分を添加した場合において peripherin 量の減少が認められた (図 3)

3) プリオン添加による peripherin の生化学的性状の変化の解析

プリオン添加により減少する N2a 細胞中の peripherin 量が絶対量の変化に由来するか否かについて細胞溶解液に含まれる界面活性剤の種類を変え検討した。SDS、NP40、Triton について検討した。その結果、SDS で溶解した場合の総細胞破碎液中の peripherin 量は prion 添加、非添加群で差異はなかった。しかし、NP40 および Triton を用いて可溶性画分中に含まれる peripherin 量を検討した結果、prion 添加により NP40、Triton 可溶性画分中の peripherin は優位に減少した (図 4)。Triton 可溶性画分中に存在する peripherin を抗 peripherin 抗体で免疫沈降し抗リン酸化抗体で検出したところ、Triton 可溶性画分中に存在する peripherin はリン酸化されていることが分かった (図 5)。

4) peripherin 過剰発現による prion の細胞内への侵入量の変化

N2a 細胞は prion 感染感受性細胞であり、北大堀内研において種々のサブクローンが樹立さ

れている。サブクローン N2a-5 は peripherin 高発現細胞であり、N2a-1 は低発現細胞である。これらの細胞に prion を含む ScN2a 細胞破碎液を添加し、細胞内へ侵入した prion 量を計測した(図 6)。その結果、peripherin 高発現 N2a-5 では N2a-1 に比べ取り込まれた prion 量が多かった。また、N2a-1 に peripherin を過剰発現させ取り込まれた prion 量を計測したところ、peripherin 過剰発現により取り込まれる prion 量の増加が確認された。

5) N2a 細胞での peripherin と prion の局在

細胞内へ取り込まれた prion と peripherin の局在について蛍光免疫染色を用いて検討した。その結果、prion 非存在下での peripherin は核周囲から細胞突起へ延びる繊維状の局在を示すが、prion 存在下では核周囲で prion を取り囲むように存在した(図 7)。

6) peripherin 非発現細胞である 293T 細胞に peripherin を強制発現させ prion を添加した。その後の peripherin の増減について検討した(図 8)。その結果、N2a 細胞同様に可溶性画分に存在する peripherin 量が添加する prion 量依存的に減少した。

D. 考察

これまでの研究から peripherin 過剰発現マウスではプリオン病の進行が促進されていることを明らかにしている。プリオン感染成立における peripherin の作用機序は明らかではないが、今回の実験から prion 感染組織および細胞破碎液の培養細胞 N2a への添加により、リン酸化された可溶性 peripherin が脱リン化され不溶性に変換されることが示唆された(図 1~5)。これは、プリオン感染に伴い新たに生成される 2 次的因子ではなく、prion そのものに起因すると考えられた(図 3)。Peripherin の過剰発現により細胞内へ取り込まれる prion 量が増加すること(図 6)、また細胞内で prion は peripherin に取り囲まれて存在すること(図 7)から、prion の細胞内への侵入と局在に peripherin 等の中間径フィラメントが関与することが示唆された。

E. 結論

peripherin をはじめとする中間径フィラメントが prion の取り込みおよび細胞内局在に関与することが示唆された。中間径フィラメントは細胞の形態を維持する細胞骨格に含まれるが、小胞輸送等に関与することも明らかにされている。また、prion の細胞内での移動に小胞輸送が関与することも報告されている。これらより、細胞内での prion の生活環に中間径フィラメントの関与が示唆される。

次年度において、prion の核周囲での特異的な局在に peripherin の脱リン酸化による局在の変化が関与する可能性について明らかにするため、peripherin の変異体作成等を行い検討する。また、非神経系細胞である 293T 細胞でも prion により peripherin の不溶化が誘導されることから 293T 細胞を用いたプリオンの細胞内動態の解析、プリオン感染感受性細胞作出についても検討する。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, **Tobiume M**, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J Immunol. 2012 Aug 15;189(4):1540-4

2. 学会発表

1) Tobiume, T., Takahashi, T., Sata, T. and Hasegawa, H. OVEREXPRESSION OF PERIPHERIN ENHANCES PROGRESSION OF PRION DISEASE IN MICE. Prion2012 May 9 - 12 Amsterdam, Netherlands)

H. 知的財産権の出願・登録状況

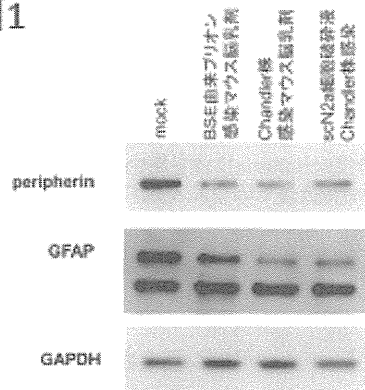
1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

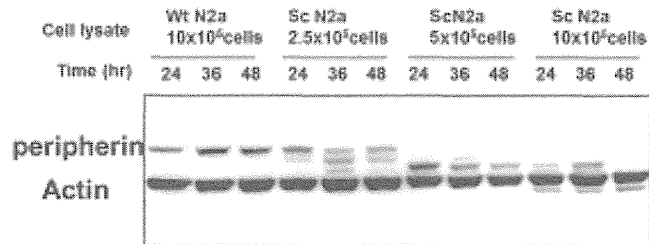
該当なし

図1



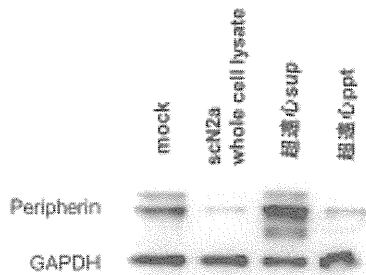
N2a細胞へBSE由来プリオン感染マウス、Chandler株感染マウス脳乳剤(各2%脳乳剤50ul/well)およびプリオン持続感染細胞SCN2a細胞破砕液(1x10⁵ cells/well)を添加し48時間後に1% triton X-100を含む細胞溶解液で溶解後、可溶性画分をウエスタンブロットに用いた。Mockは非感染マウス脳乳剤添加。プリオン感染脳乳剤添加群および持続感染細胞破砕液添加群においてperipherinおよびGFAPの減少が認められた。

図2



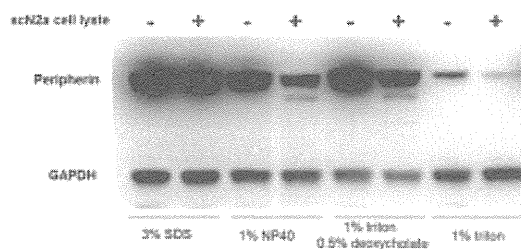
1% triton X-100により可溶化されるperipherinは添加するプリオン持続感染細胞破砕液(SCN2a)量および培養時間異存的に減少した。

図3



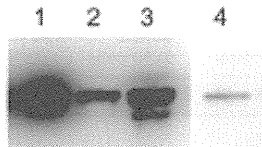
プリオン持続感染細胞破砕液の超遠心の沈殿画分(超遠心ppt)添加によりperipherin量は減少したが超遠心上清(超遠心sup)ではおよび培養時間異存的に減少した。

図4



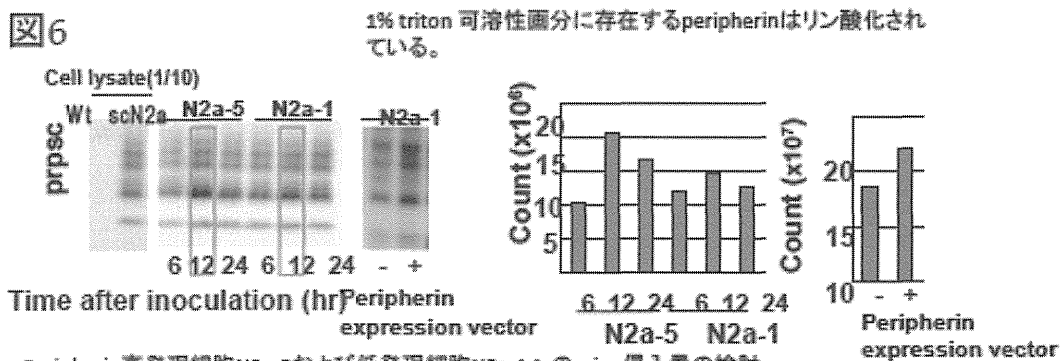
プリオン持続感染細胞破砕液添加48時間後の総細胞溶解液に含まれるperipherin量(3%SDS処理群)に変化は無い。1% triton X-100により可溶化されるperipherin量の顕著な減少が認められた。NP40やデオキシコレートを含む強い界面活性剤を用いた場合、差異の確認が困難となった。

図5



- 1: N2a total cell lysate
- 2: N2a 1% triton 可溶性画分
- 3: N2a 1% triton 可溶性画分の抗peripherin抗体を用いた免疫沈降物の抗peripherin抗体でのウエスタンロット
- 4: N2a 1% triton 可溶性画分の抗peripherin抗体を用いた免疫沈降物の抗リン酸化抗体を用いたウエスタンロット

図6

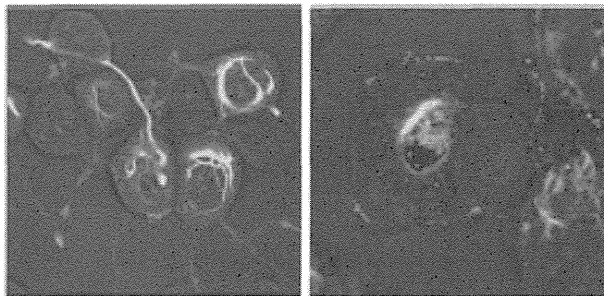


Peripherin高発現細胞N2a-5および低発現細胞N2a-1へのprion侵入量の検討

左: N2a-5およびN2a-1へSCN2a細胞破砕液を添加し、6、12、24時間後の細胞内prion量を比較した。

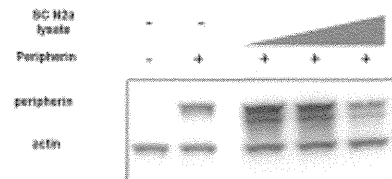
peripherin低発現細胞株N2a-1へはperipherin発現ベクターのトランスフェクションにより過剰発現させ細胞内Prion量を比較した。右はウエスタンロットのい結果を電子度メーターによりグラフ化したもの。Prionの取り込み量はN2a-5細胞で多く、peripherinトランスフェクションN2a-1では非トランスフェクションに比べ多かった。

図7



左: 緑はprion非存在下でのperipherinの細胞内局在
右: 緑はperipherin、赤はprion
核周囲でprionを取り囲むようにperipherinが局在する。

図8



293T細胞にperipherinをトランスフェクションしSCN2a細胞破砕液の添加48時間後の可溶性peripherin量の変化。
293T細胞においてもprion添加により可溶性Peripherinの減少が認められた。

8. 定型および非定型BSEプリオンの蛋白質化学的比較解析

分担研究者 萩原健一 国立感染症研究所 細胞化学部 第1室室長

研究要旨

PrP^{Sc}凝集体の構造については、これまでに複数の推定モデルが提唱されている。しかし、一糖鎖型 PrP^{Sc} について、PrP^{Sc} の糖鎖付加部位である2つの Asn 残基に対して糖鎖がどのような比率で付加しているのかについて現時点では情報が乏しく、PrP^{Sc} の構成分子として二糖鎖型分子のみを考慮した暫定的なモデルになっている。非定型 L-BSE (BSE/JP24) プリオンは、古典型 BSE (C-BSE) プリオンとは異なり一糖鎖型 PrP^{Sc} の割合が高いという蛋白質化学的な特徴を有し、一糖鎖型の高い比率が L-BSE プリオンの PrP^{Sc} 凝集体構造に少なからず寄与していると想像される。そこで本研究では、L-BSE プリオンと C-BSE プリオンの一糖鎖型 PrP^{Sc} について、2箇所の Asn 残基 (ウシ・プリオン蛋白質の Asn¹⁹² と Asn²⁰⁸ が付加部位候補である) の糖鎖付加の実体を解明すべく解析を進めた。また、L-BSE プリオンは近交系マウスへの直接伝播が不能であることがこれまでに示されているが、一旦カニクイサルへ伝播させた後の L-BSE プリオンは近交系マウスへ伝播可能であろうか (=ヒト・モデルへ初代伝播した後では L-BSE プリオンの性状が変化するだろうか?) という点について検討を行った。

A. 研究目的

BSE/JP24 のウシ脳組織には異常型プリオン蛋白質 (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、BSE/JP24 のプリオン (L-BSE プリオン) と古典的 BSE プリオン (C-BSE プリオン) が近交系マウスなどに対して相いに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]。L-BSE プリオンは、C-BSE プリオンとは異なり一糖鎖型 PrP^{Sc} の割合が高いという蛋白質化学的な特徴を有し、一糖鎖型の高い比率が L-BSE プリオンの PrP^{Sc} 凝集体構造-ひいては病原性など-に少なからず寄与していると想像される。本研究では、BSE プリオンの一糖鎖型 PrP^{Sc} においては糖鎖が2箇所の Asn 残基のうちのどちらか一方に偏って占有しているのだろうか、それとも均等半々に付加しているの

だろうか? という疑問点を蛋白質化学的に明らかにすることを目的とする。また、L-BSE プリオンをカニクイサルへ伝播させた後の近交系マウスに対する病原性について検討することを目的とする。これにより、C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの比較・考察が深まると期待される。

B. 研究方法

1) 糖鎖を有するリコンビナント・ウシ PrP の調製とウエスタンブロット法による解析

前年度までの研究により、PrP^{Sc} を酵素消化して得られる断片ペプチドの質量分析から PrP^{Sc} の2箇所の Asn 残基に対する糖鎖付加の占有比を決定するという方法は、断片ペプチドの溶解性・回収率が低いために容易ではないことがわかった。そこで前年度までの研究において有望であったウエスタンブロット法による解析を進めることにした。方法の原理は、前年度報告書に記したとおりである。

ウエスタンブロット法による解析では、PrP^{Sc}

をリジルエンドペプチダーゼにより限定分解して得た Asn¹⁹² 含有ペプチド断片の糖鎖の有無を SDS-PAGE/ウエスタンブロットにより検出・計測し、計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一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖の帰属 (Asn¹⁹² または Asn²⁰⁸) を決める。本法が分析法として適正であることを証明するために、今回、Asn¹⁹² あるいは Asn²⁰⁸ のいずれか片方の糖鎖付加部位を Asp 酸基に改変したウシ・リコンビナント PrP 標品を調製し、標品の測定値から導かれる結果がリコンビナントの既知の糖鎖修飾比に合致するか否かを確認することにした。Asn¹⁹² あるいは Asn²⁰⁸ のいずれか片方のコドン を Asp コドンに改変したリコンビナント・ウシ cDNA を作成し、これを発現ベクター pIB/V5 (Invitrogen) に挿入した。この組換え DNA を Cellfectin 試薬 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法により昆虫細胞 (Sf9 細胞) または哺乳動物の N-型糖鎖の糖転移酵素を発現させた Sf9 細胞 (mimic Sf9 細胞、Invitrogen) に導入して Asn¹⁹² と Asn²⁰⁸ のどちらかの糖鎖を欠く 2 つの変異 PrP 標品を発現させ、細胞膜画分を標品として用いた。2 種の膜画分標品を任意の割合で混合し、リジルエンドペプチダーゼ消化後の試料をウエスタンブロット法にかけ、2 標品の混合比から決まる混合標品中の Asn¹⁹² の糖鎖存在量と実際の計測値が合致するか否かを検討した。なお、ウエスタンブロット法は、前年度の報告書に記した要領で行った。

2) カニクイザルへ伝播させた後の L-BSE プリオンの近交系マウスへ伝播実験

C-BSE プリオンおよび L-BSE プリオンをそれぞれ一次伝播させたカニクイザルの脳 (視床部) は、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」で得た材料を用いた。脳ホモジネートをリン酸ナトリウム緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline) にて調製し、ホモジネート中の PrP^{Sc} をウエスタンブロット法および ELISA 法により定量した。PrP^{Sc} 含量が等量になるように接種剤を調製 (#7 サル由来 C-BSE

プリオン、0.4%ホモジネート 25 μ L; #15 サル由来 L-BSE プリオン、1%ホモジネート 25 μ L) し、C57BL/6J マウスへ脳内接種して経過の観察を続けた。対照群として、健常カニクイザルの脳ホモジネート (#8 サル由来、1%ホモジネート 25 μ L) を同マウスへ脳内接種した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験は国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。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。動物実験は国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得た上で、動物の愛護及び管理に関する法律を遵守し実施した。

C. 研究結果

1) 糖鎖を有するリコンビナント・ウシ PrP の調製とウエスタンブロット法による解析

今回、Asn¹⁹² と Asn²⁰⁸ の糖鎖修飾率が既知のリコンビナント PrP 標品を調製し、2 標品の混合して分析にかけ、混合比から決まるリコンビナントの既知の糖鎖修飾比と標品の測定値から導かれる結果が合致するか否かを検討した。

リコンビナント・ウシ PrP の調製には内在性 PrP^C を発現しない昆虫細胞 Sf9 と mimic Sf9 の 2 種を選んだ。Sf9 細胞は無血清培地が使用できる利点がある反面、N-型糖鎖は高マンノース型にとどまる。mimic Sf9 細胞は高マンノース型以降の糖鎖のプロセッシング・付加が起こり得るが、培養にはシアル酸の供給源となる血清等の添加が必要とされる。2 種の細胞にウシ PrP の Asn¹⁹² または Asn²⁰⁸ を Asp へ変異させた cDNA を導入してリコンビナント PrP を発現させたところ、どちらの細胞でも目的の糖鎖付加体が得られたが、Sf9 細胞を用いた場合には糖鎖付加による電気泳動上の移動度シフト幅が小さいため、標品調製に mimic Sf9 細胞を用いることにした。この標品 (= Asn¹⁹² または Asn²⁰⁸ の Asp 変異体) を含む細胞の膜画分を用いてウエスタンブロット法による解析を行ったところ、予備実験の段階ながら、測定値が試料の糖鎖付加を反映することが確認できた。今後、測定実績を重ねて本分析法を確立さ

せ、L-BSE プリオンと C-BSE プリオンの一糖鎖型 PrP^{Sc} 分子の糖鎖付加の実体を明らかにしたい。

2) カニクイザルへ伝播させた後の L-BSE プリオンの近交系マウスへ伝播実験

L-BSE プリオンを一次伝播させたカニクイザルの脳ホモジネートを接種したマウスは、接種後 400 日を経過した時点において神経症状は呈しておらず、また、脳内に PrP^{Sc} も検出されていない。一方、C-BSE プリオンを一次伝播させたカニクイザルの脳ホモジネートを接種したマウスは、顕著な神経症状を呈し、脳内に PrP^{Sc} の蓄積を認めた。

D. 考察

前年度に試験的に行ったウエスタンブロット法に基づく BSE プリオンの一糖鎖型 PrP^{Sc} の分析によれば、C-BSE の一糖鎖型 PrP^{Sc} であっても L-BSE の一糖鎖型 PrP^{Sc} であっても 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ている。今年度の標準試料を用いた実験から、ウエスタンブロット法が適正な結果を与える分析法であることが確認でき、これにより前年度の予備実験の結果の信頼度が高まった。BSE 罹患ウシでの PrP^{Sc} の一糖鎖型の糖鎖が主として Asn²⁰⁸ に検出されているのは、i) そもそも健常ウシ PrP^C の一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のか、ii) PrP^{Sc} への変換過程で Asn²⁰⁸ の一糖鎖型が選択されるのか、あるいは iii) PrP^{Sc} への変換後に Asn¹⁹² の糖鎖が切断・除去されるためなのか、この点についての現時点での洞察は難しい。しかし、一糖鎖型の糖鎖付加の実体を明らかにすることは、PrP^{Sc} 凝集体のモデル構造の構築へ大きく寄与するものと思われる。なお、一糖鎖型 PrP^{Sc} での Asn¹⁹² への糖鎖修飾率が低いことから、もしも上述の i) が正しいならば PrP^C の Asn¹⁹² への糖鎖付加に先行して Asn²⁰⁸ への糖鎖付加が起こるのではないかと(糖鎖付加反応が Asn²⁰⁸ → Asn¹⁹² の 2 段階で起こるため、Asn¹⁹² 単独の糖鎖付加は存在しないのではないかと) という可能性も考えられたが、少なくとも昆虫細胞の発現系においては Asn¹⁹² と Asn²⁰⁸

への糖鎖付加は互いに独立して、優位性無く起こることが示された。

マウスへの感染実験は、C-BSE、L-BSE プリオンの病原性の特徴がカニクイザルへ伝播後も変わらないことを示しつつある。

E. 結論

前年度のデータと合わせて、C-BSE でも L-BSE でも、一糖鎖型 PrP^{Sc} での Asn¹⁹² への糖鎖修飾率は低いことが示された。しかし、本データを相補すべき Asn²⁰⁸ の糖鎖付加に関する直接の実験データが、技術的難点から未だ得られていない。両者のデータを統合して判断することが重要であり、Asn²⁰⁸ の糖鎖付加の定量化法の確立が今後の課題であると考えられる。マウスへの感染実験は、継続して経過を観察し、最終年度までに興味深い結果が得られるものと期待される。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara, H., Okemoto-Nakamura, Y., Shinkai-Ouchi, F., Hanada, K., Yamakawa, Y., and Hagiwara, K. Mouse prion protein (PrP) segment 100 to 104 regulates conversion of PrP^C to PrP^{Sc} in prion-infected neuroblastoma cells. *J. Virol.*, 86: 5626-5636, 2012
- 2) Hagiwara, K. Hara, H., and Hanada, K. Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science. *J. Biochem.*, 153: 139-145, 2013
- 3) 中村 優子、萩原 健一 BSE 問題におけるリスク管理とその変遷. *ファルマシア*, 49: 48-51, 2013

2. 学会発表

- 1) Hara, H., Okemoto-Nakamura, Y., Shinkai-Ouchi, F., Yamakawa, Y., Hanada, K., and Hagiwara, K. Mouse prion protein (PrP) segment 100 to 104 regulates conversion of PrP^C to PrP^{Sc} in

prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012 (July, 29-30, 2011, Yokohama, Japan)

- 2) Ono, F., Shibata, H., Kurosawa, A., Yamakawa, Y., Tobiume, M., Sato, Y., Katano, H., Hagiwara, K., Saito, N., Komatuzaki, K., Nakamura, K., Emoto, Y., Hamano, M., Yasutomi, Y., and Sata, T. Assessment of memory disorder by using retrieval task test in classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions transmitted cynomolgus macaques. Asian Pacific

Prion Symposium 2012 (July, 29-30, 2011, Yokohama, 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

9. 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

分担研究者 福田 茂夫 道総研 畜産試験場 基盤研究部 畜産工学G 研究主任
研究協力者 陰山 聡一 道総研 畜産試験場 基盤研究部 畜産工学G 研究主幹
藤井 貴志 道総研 畜産試験場 基盤研究部 畜産工学G 研究職員
岡田 洋之 動物衛生研究所 プリオン病研究センター 上席研究員
横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター 領域長補佐

研究要旨

本研究では、非定型 BSE の臨床症状の客観的評価法について検討し、非定型 BSE 感染牛の臨床症状と脳における病変や PrP^{Sc} 蓄積との関連性を明らかにすることを目的とする。本年度は、昨年度作出した非定型および定型 BSE 脳内接種牛、対照牛の臨床症状の記録、行動量測定、歩様動画データの採取および聴性脳幹誘発電位 (BAEP) 測定を行い、臨床症状の客観的評価に資するデータを採取した。非定型 BSE 脳内接種牛 2 頭については、接種後 15 ヶ月で病理解剖し、脳組織全域における高度の PrP^{Sc} の蓄積を確認した。非定型 BSE 脳内接種牛では、脳内接種後 14 ヶ月より、走行時に若干の後肢の踰躑が見られたが、その他の臨床症状検査に対する反応は現れず、臨床症状は不明瞭であった。脳内接種後 6~15 ヶ月における BAEP 測定値を解析したところ、接種後月数の経過にともなう BAEP 各波の測定値に変化は無かった。行動量および歩様動画データについては現在詳細な解析を行っている。

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 患者が非定型 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、飼養困難となるまでの期間が定型 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が明らかとなっている。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。

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の客観的な評価法を確立し、非定型 BSE を発見する方法の確立が求められる。

本課題では、非定型 BSE 実験感染牛の臨床症

状の詳細な記録、歩数計による行動量の測定、歩様の解析および聴性脳幹誘発電位 (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採取する。また、非定型 BSE 実験感染牛の脳における空胞変成、PrP^{Sc} 蓄積と臨床的変化との関係を明らかにする。

B. 研究方法

1) 非定型 BSE プリオン感染牛の臨床症状の評価法の検討

昨年度作出した非定型 BSE 脳内接種牛 2 頭、定型 BSE 脳内接種牛 1 頭および対照牛 3 頭について、毎週臨床症状検査に対する反応を観察するとともに、接種後 6 ヶ月より毎月血液採取および BAEP 測定を、接種後 12 ヶ月よりモーションキャプチャによる歩様解析のためのビデオ撮影を行った。また、接種後 6 ヶ月より供試牛に歩数計を装着し行動量を調査した。

2) 非定型 BSE プリオン感染牛の PrP^{Sc} 蓄積と病変の解析

非定型 BSE 脳内接種牛 2 頭について、接種後 15 ヶ月で病理解剖を行い、中枢神経系組織および末梢組織を採取した。病理解剖および組織の採取は、BSE 感染実験室（動物バイオセーフティー基準（ABSL）3）にて行った。

（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) 非定型 BSE プリオン感染牛の臨床症状の評価法の検討

供試牛の臨床症状検査に対する反応を表 1 に示した。非定型 BSE 脳内接種牛 2 頭に接種後 14 ヶ月より走行時に若干の後肢の蹠踉が観察された。一方、その他の臨床症状検査に対する反応は無く、臨床症状は不明瞭であった。定型 BSE 脳内接種牛および対照牛については現在までのところ臨床症状検査に対する反応に変化は無い。

接種後 6 ヶ月から 15 ヶ月における供試牛の BAEP 測定値を解析した（表 2）。非定型 BSE および定型 BSE 脳内接種牛の BAEP 各波の潜時および波間潜時は、接種後の経過に伴う変化は無く、対照牛との差も無かった。

血液成分、行動量および歩様動画データについては現在詳細な解析を行っている。

2) 非定型 BSE プリオン感染牛の PrP^{Sc} 蓄積と病変の解析

非定型 BSE 脳内接種牛 2 頭について、接種後 15 ヶ月で病理解剖を行い、中枢神経系組織における PrP^{Sc} 蓄積を解析したところ、脳ならびに脊髄において広範囲かつ高度に PrP^{Sc} が蓄積していた（図 1）。

D. 考察

非定型 BSE 脳内接種牛では、接種後 14 ヶ月より走行時に後肢の蹠踉が見られた。一方、音や動く物に対する異常な反応はなく、臨床症状は不明瞭であり、これまでの知見と一致するものであった。行動量および歩様動画データについては、今後の解析により、BSE 感染牛に特徴的な変化がないか検討する。

作出した非定型 BSE 感染牛では、中枢神経系組織における広範囲かつ高度に PrP^{Sc} が蓄積していたにも関わらず、解剖直前においても BAEP の測定値に異常は無く、非定型 BSE を BAEP 測定により検出することは困難であった。これまでの研究では、定型 BSE における BAEP 測定値の異常と聴覚神経路病変に関連があることを明らかにしている（Arai *et al.*, 2009, Fukuda *et al.*, 2011）。今回の結果の解釈には、非定型 BSE 感染牛の聴覚神経路における空胞変性病変、PrP^{Sc} 蓄積の解析が必要である。

E. 結論

非定型 BSE 脳内接種牛について、接種後より臨床症状検査、血液検査、行動量、歩様動画および BAEP 測定データの採取を行い、接種後 15 ヶ月で病理解剖した。中枢神経系組織全域における高度の PrP^{Sc} 蓄積が確認された。非定型 BSE 脳内接種牛は接種後 14 ヶ月より走行時に後肢の蹠踉が観察されたが、その他の臨床症状検査に対する反応はなく、臨床症状は不明瞭であった。また、脳内接種後 6~15 ヶ月における BAEP 測定値を解析したが、BAEP 各波の経過に伴う測定値に変化は無かった。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada H, Iwamaru Y, Kakizaki M, Masujin K, Imamura M, Fukuda S, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Mohri S, Yokoyama T. Properties of L-type bovine spongiform encephalopathy in intraspecies passages. *Vet Pathol.* 2012

49(5):819-823.

2. 学会発表

- 1) Fukuda S, Fujii T, Kageyama S, Okada H, Yokoyama T, Murayama Y, Preclinical detection of PrP^{Sc} in eyes of BSE-affected cattle. APPS2012. Yokohama, July 29-30, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。

表 1. BSE 感染牛の臨床症状検査に対する反応

	牛No	臨床症状検査			
		姿勢・行動 ¹⁾	歩様・走行姿勢 ²⁾	聴覚刺激検査 ³⁾	視覚刺激検査 ⁴⁾
非定型BSE	5184	—	14ヶ月より後肢蹠踉	—	—
	6802	—	14ヶ月より後肢蹠踉	—	—
定型BSE	6697	—	—	—	—
	5795	—	—	—	—
対照	5825	—	—	—	—
	9050	—	—	—	—

*接種後15ヶ月までのデータ

- 1) 牛房内の佇立姿勢、対人行動、精神状態（興奮、沈鬱）を観察
2) 歩行・走行を促し、歩様や走行姿勢を観察
3) 拍手音・金属音に対する反応の観察
4) クリップボードを振り動かし視覚刺激に対する反応を観察

表2. BSE感染牛のBAEPの潜時および波間潜時

	非定型BSE		定型BSE	対照 ¹⁾
	5184	6802	6697	
	潜時(msec)		潜時(msec)	潜時(msec)
I	1.46	1.5	1.53	1.49±0.1
II	2.45	2.47	2.55	2.47±0.11
III	3.46	3.59	3.59	3.47±0.14
V	4.58	4.54	4.58	4.52±0.1
	波間潜時(msec)		波間潜時(msec)	波間潜時(msec)
I-III	2	2.09	2.06	1.97±0.11
III-V	1.12	0.95	0.99	1.02±0.07
I-V	3.12	3.04	3.05	3.11±0.05

刺激音圧105dB I：聴神経 II：延髄 III：橋 V：中脳

1)対照牛3頭の平均値±標準誤差

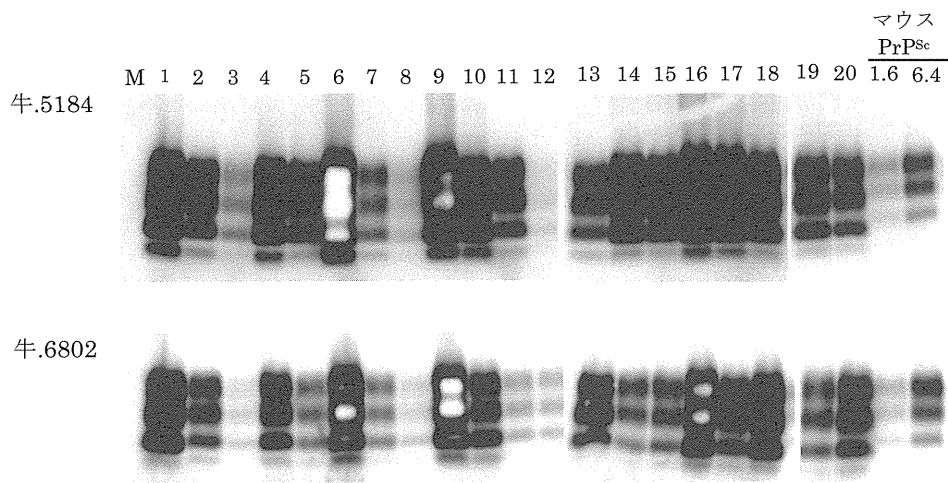


図 1. 非定型 BSE 脳内接種牛の脳における PrP^{Sc} の蓄積

マウス PrP^{Sc} : BSE 接種マウス脳組織 1.6ug, 6.4ug/レーン

- | | | | |
|--------------|--------------|----------------|---------------|
| 1 : 嗅脚 | 6 : 視床 | 1 1 : 後頭部 大脳皮質 | 1 6 : 中脳 |
| 2 : 前頭 大脳皮質 | 7 : 側頭部 大脳皮質 | 1 2 : 後頭部 大脳髄質 | 1 7 : 橋 |
| 3 : 前頭部 大脳髄質 | 8 : 大脳髄質 | 1 3 : 小脳皮質 | 1 8 : 延髄門部 |
| 4 : 線条体 | 9 : 視床 | 1 4 : 小脳髄質 | 1 9 : 脊髄 頸膨大部 |
| 5 : 頭頂部 大脳皮質 | 1 0 : 海馬 | 1 5 : 小脳脚 | 2 0 : 脊髄 腰膨大部 |

10. プリオン感染動物における母子感染モデルの検討

分担研究者 室井 喜景 帯広畜産大学基礎獣医学研究部門 助教

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。昨年度は、感染・妊娠動物のプリオンの分布について検討した。本年度は母子感染成立の可能性、産仔の PrP^{res} 抵抗性の獲得を中心に病理学的検索を行った。BSE および Scrapie 由来 PrP^{res} を経口感染させたマウスを交配し、得られた産仔の一部は約 500 日齢まで経過観察を行い、脳および脾臓を採材し、抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色を行った。また、他の産仔は、抵抗性を検討するために BSE および Scrapie 脳乳剤を脳内接種し、非感染マウス産仔と終末期までの日数を比較した。母子感染の可能性を検討した BSE、Scrapie 株経口感染マウスの産仔の脳および脾臓は、いずれも PrP^{res} 陰性であった。また、PrP^{res} 抵抗性を検索できた Scrapie 株経口感染マウスの産仔は、非感染マウス産仔と比較して、終末期までの日数に顕著な差は認められなかった。本研究より、BSE および Scrapie 株経口感染マウスでは、母子感染は起こらないこと、その産仔はプリオンに対する抵抗性を得られないことが示唆された。

A. 研究目的

家畜のプリオン病である BSE や、ヒツジ、ヤギの Scrapie の主な感染経路は経口感染であるが、母子感染の可能性についても議論されている。BSE に関しては BSE 野外例の胎盤、乳汁から PrP^{res} は検出されず、BSE 発症牛の産仔の追跡調査結果からも、野外での母子感染による感染拡大の可能性は否定されている。一方、Scrapie では、Scrapie 感染ヒツジおよびヤギの胎盤から PrP^{res} が検出されており、また、感染ヒツジの乳汁を子ヒツジに投与した実験では、子ヒツジで感染が成立し、乳汁の感染性が確認されている。さらに、産仔の感染率の疫学調査からも母子感染が示唆されている。最近、PMCA を用いた検査法により、Scrapie 感染ヒツジの羊水、胎仔脳、脾臓、リンパ節、消化管から PrP^{res} が検出され、直接的な証拠として、後産もしくは乳汁の摂取に加え、感染経路として子宮内経胎盤感染が成立することが報告された。本研究では、BSE および Scrapie 株感染マウスでの病態の検討および Scrapie における母子感染の成立因子の検討を目的として、BSE および Scrapie 由来 PrP^{res} 株経口感染マウスを用いて、免疫組織化学的手法による BSE および Scrapie 感染モデル動物としての評価を行った。すなわち、実験 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(図 1)。このうち、実験 1) については昨年度報告した。本年度は、実験 2) 母子感染成立の可能性、3) 産仔の PrP^{res} 抵抗性の獲得について検討を行った。これに加えて、実験 4) として、経口接種と脳内接種マウスの末梢神経病変について検討したので、併せて報告する。

B. 研究方法

実験 2

1) 供試動物

母子感染成立の可能性を評価するために、昨年度作製した妊娠マウスの内、BSE 株経口感染マウスから得られた産仔 5 匹、および Scrapie 株経口感染マウスから得られた産仔 5 匹を用いた。約 500 日齢で解剖し、脳、脾臓を採材した。

2) 組織学的検索および免疫組織化学的検索

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 T1 抗体を用いて免疫組織化学的染色(IHC 法)を実施した。

実験 3

1) 供試動物

産仔の抵抗性の有無を評価するために、Scrapie 株経口投与マウスから得られた産仔 5 匹と、非感染マウスから得られた産仔 8 匹に、Scrapie 帯広株を用いて作製された 10 % 脳乳剤入り PBS を 20 μ l 脳内接種した。また、BSE 株経口投与マウス 1 匹から得られた産仔 3 匹と、非感染マウスから得られた産仔 5 匹に、BSE マウス馴化株を用いて作製された 10 % 脳乳剤入り PBS を 20 μ l 脳内接種した。沈鬱、削瘦、起立不能などの臨床症状がみられた終末期に解剖し、脳、脾臓を採材した。

2) 組織学的検索および免疫組織化学的検索
実験 2 と同様の方法にて実施した。

実験 4

1) 供試動物

PrP^{res} の体内伝播ルートの検討を目的として、実験 1 にて得られた BSE 株および Scrapie 株経口感染マウスと、実験 3 にて得られた BSE 株および Scrapie 株脳内接種マウスの脳、消化管、リンパ装置、骨格筋および末梢神経を用いて、脳内の PrP^{res} 分布、消化管神経叢への PrP^{res} 分布の比較検討を行った。

2) 組織学的検索および免疫組織化学的検索
実験 2 と同様の方法にて実施した。

(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

実験 2

BSE および Scrapie 株経口感染マウスから得られた産仔はいずれも、経過観察中、臨床症状を示さなかった。また、剖検時、肉眼的に脳外観および矢状断面、冠状断面に著変は認められなかった。また、脾臓においても著変は認められなかった。BSE および Scrapie 株経口感染マウスのいずれの産仔も、脳、脾臓への PrP^{res} 沈着は認められなかった。

実験 3

BSE 脳乳剤を脳内接種した産仔の母マウスである BSE 株経口投与マウスでは、経口投与後 434

日の時点で、脳および脾臓への PrP^{res} 沈着は確認されず、感染は成立しなかった。Scrapie 脳乳剤を脳内接種した産仔の母マウスでは、脳および脾臓への PrP^{res} 沈着が確認された。したがって、本実験では、Scrapie 株経口感染マウスから得られた産仔についてのみ、PrP^{res} 抵抗性について検索を行った。

Scrapie 脳乳剤を脳内接種した Scrapie 株経口感染マウス産仔および非感染マウス産仔はともに、まず被毛粗剛、沈鬱などの症状を呈し、その後次第に衰弱し、歩様異常、起立不能となり、終末期に至った。Scrapie 株経口感染マウス産仔の内、脳内接種後、症状を呈したマウスは 5 匹中 4 匹、終末期までの日数は、接種後約 170 日であった。一方、非感染マウス産仔では、症状を呈したマウスは 8 匹中 7 匹、終末期までの日数は、接種後 172 日であった(表 1)。したがって、Scrapie 株経口感染マウス産仔と非感染マウス産仔の間で、脳内接種後、終末期までの日数に顕著な差は認められなかった。

実験 4

脳では、BSE 株および Scrapie 株経口感染マウスともに、視床および脳幹部において強い PrP^{res} 陽性反応がみられた。また、BSE 株および Scrapie 株脳内接種マウスでも同様に、視床および脳幹部に PrP^{res} が沈着していたが、経口感染マウスと比較して強い陽性反応を示した。

脾臓、リンパ節等に PrP^{res} 沈着が確認されたが、脊髄神経節を除く PNS および筋紡錘への PrP^{res} 沈着はいずれの株においても見られなかった。消化管では、昨年度報告したように、Scrapie 株経口感染マウスにおいて消化管神経叢へ PrP^{res} が沈着し、BSE 株経口感染マウスでは消化管全長にわたって PrP^{res} 陰性であった。一方、BSE 株および Scrapie 株脳内接種マウスではともに、全長にわたって消化管神経叢は PrP^{res} 陰性であった(表 2 および図 2)。

D. 考察

ヒツジとマウスの胎盤を構造により分類すると、ヒツジの胎盤は結合織絨毛胎盤で、マウスの胎盤は血絨毛性迷路性胎盤に分類される。この 2 種類の胎盤の大きな違いは、母体組織と胎仔組織で構成される、胎盤血液関門の構造の違いである。ヒツジの結合織絨毛胎盤は、母体の子宮上皮と、胎

仔の栄養膜細胞層とが密着結合 (tight junction) を形成している。多核栄養膜細胞は栄養膜細胞層を遊走し、偽足を出して母体の子宮上皮細胞へ挿入される。そこで細胞膜融合し、胎仔と母体のハイブリッド細胞が形成される。Scrapie 野外例の胎盤では、主に胎仔栄養膜細胞層へ PrP^{res} が多く沈着することが報告されている。ヒツジと牛はともに結合繊絨毛胎盤であるが、牛ではヒツジで見られるような胎仔栄養膜細胞と母体子宮上皮の融合は見られず、ハイブリッド細胞は形成されない。このことから、BSE 野外例の牛の胎盤への PrP^{res} 沈着が見られない理由の一つとして、この胎仔栄養膜細胞と母体子宮上皮が融合しないことが可能性として指摘されている。マウスの血絨毛性迷路性胎盤では、栄養膜合体層が子宮内膜を侵食し、母体血管を取り込み、血管内皮を破壊して母体血液を直接栄養膜の裂孔中に引き入れる。その後栄養膜細胞によって迷路が形成され、迷路の壁の中に胎仔結合組織及び胎仔血管が入ってきて、栄養膜細胞を介して胎仔血管は母体血液に接する。このように、マウスの胎盤でも、胎仔と母体のハイブリッド細胞は形成されない。Scrapie 感染ヒツジに対する検索方法とは異なるものの、このことが、マウスでは母子感染が成立しない一つの因子と推察された。

PrP^{res} への産子の抵抗性の獲得については、検索できた Scrapie 株経口感染マウスの産子では、Scrapie 由来 PrP^{res} への抵抗性の獲得は確認できなかった。TSE の特徴として、PrP^{res} は宿主に普遍的に存在する正常プリオン蛋白由来であるため、宿主では PrP^{res} に対する免疫応答がないため、抗体産生は起こらないことはよく知られている。過去の類似の実験として、出産 1、2 日前に妊娠マウスへ Scrapie 株脳乳剤を脳内接種し、その後得られた産仔に対して、同じく Scrapie 株脳乳剤を腹腔内接種し、非感染マウスと潜伏期間を比較したことが報告されている。その実験では、Scrapie 株脳内接種マウス産子と非感染マウスの間で、潜伏期間に顕著な差は認められず、産子は Scrapie 由来 PrP^{res} に対する抵抗性を獲得しないことが示唆されている。本研究は感染成立母マウス産仔に対するものであり、過去の実験とは異なるものの、本研究でも抵抗性は得られないことが結論された。この結果

は、プリオン病では抗体の産生がおこらず、胎盤からの抗体の移行もおこらないことによるものと推察された。

ヒトの家族性プリオン病由来 PrP^{res} 株を脳内接種したマウスを用いた実験では、消化管神経叢への PrP^{res} 沈着が確認されており、PrP^{res} の CNS から PNS への遠心性の伝播も示唆されている。今回、脳内接種では、BSE 株および Scrapie 株ともに消化管神経叢への PrP^{res} の沈着が確認されず、動物プリオン株での遠心性伝播を示唆する所見は得られなかった。このことから、Scrapie 株経口感染マウスの消化管神経叢における PrP^{res} 沈着は、一端脳内に侵入したプリオンの遠心性伝播ではなく、求心性伝播によるものと考えられた。BSE 株経口感染マウスで消化管神経叢へ PrP^{res} 沈着がみられない理由は明らかではないが、株の生物学的性状を含め更なる検討が必要である。

E. 結論

BSE およびスクレイピー経口感染マウスでは、母子感染は成立しないこと、産仔はプリオン抵抗性を獲得しないと考えられた。

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

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

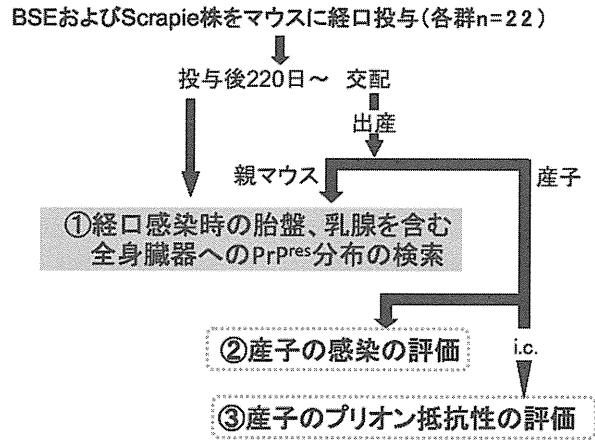


図 1. 本研究の概要

表 1. Scrapie 株経口感染マウス産子のプリオン抵抗性評価

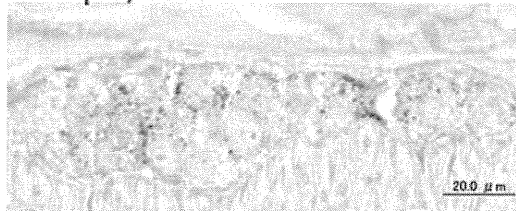
	発症率	終末期までの日数 (Mean±SD)
Scrapie感染マウス産子	80% (5匹中4匹)	169.8±6.8
非感染マウス産子	88% (8匹中7匹)	172.8±7.3

表 2 消化管におけるプリオン分布

	D.O.		i.c.	
	Scrapie (318±24)*	BSE (312±46)	Scrapie (174±9.4)	BSE (176±6.9)
Esophagus	-	-	-	-
Stomach	+	-	-	-
Small intestine	+	-	-	-
Cecum	++	-	-	-
Large intestine	++	-	-	-

*Mean incubation period(days)(Mean±SD)

Scrapie; cecum



BSE; large intestine

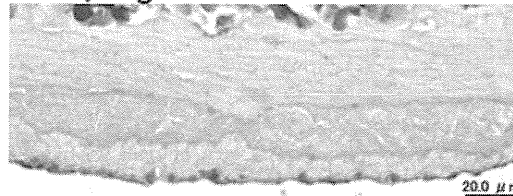


図 2 Scrapie および BSE 経口感染マウス空回腸筋層間神経叢の T1 抗体による免疫染色

11. 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 感染サルから輸血後、4 年 9 ヶ月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。各組織乳剤をリンタングステン酸 (PTA) 沈殿法により濃縮して増幅した結果、頭頂葉髄質、脊髄頸部神経根、座骨神経、鼠径リンパ節から極微量の PrP^{Sc} を検出し、輸血によるプリオンの伝達を霊長類ではじめて実証した。このサルでは中枢神経系にも 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ある。PTA 沈殿法は尿中に含まれる PrP^{Sc} の濃縮にも有効であり、経口投与未発症サルの解剖時に採取した尿から PrP^{Sc} を検出した。また、ヘパリン存在下、マルチステップ PMCA 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、PrP^{Sc} 体内動態の解析にはさらなる増幅効率の改善が必要である。

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 protein misfolding cyclic amplification (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 による解析を経口接種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。また、非定型 BSE が経口感染により霊長類に伝達されることが示されており、畜産分野のみならず、食の安全性確保のためにも非定型 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 接種サル由来 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) vCJD 輸血感染モデル

霊長類医科学研究センターで作出された定型 BSE 感染サルから輸血継代したサル(#013)を解析した。このサルは輸血後、4 年 9 ヶ月を経過しても、いかなる神経症状も示さず、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類(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。

2) 輸血サルにおける PrP^{Sc} の体内分布

輸血に用いた血液中に含まれる PrP^{Sc} は極微量であったため、10%組織乳剤や体液類はリンタングステン酸 (PTA) 沈殿法により 3~100 倍に濃縮した後、シードとして用いた。サンプル毎に 2 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（8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。

3) 経口感染サルの体液におけるPrP^{Sc}分布

定型BSEを経口投与後、7.5年を経過して未発症であったサル(#006)の体液におけるPrP^{Sc}分布を調べるため、脳脊髄液や尿などをPTA沈殿法で100倍に濃縮し、PMCA解析した。

4) 非定型BSE感染サル由来PrP^{Sc}の増幅

非定型BSE(JP24)を脳内接種後、発症したカニクイザル(#014)の10%脳乳剤から10倍希釈系列を作製し、PMCAシードとして用いた。ヘパリン存在下、10サイクルごとに培養温度と超音波照射条件を変更するマルチステップPMCA(31-33°Cの低温領域で15秒の連続照射を一回、35-37°Cで2秒の断続的照射を15回、各サイクルごとに実施)により増幅した。

(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施設内に導入した。

C. 研究結果

1) 輸血後未発症サルにおけるPrP^{Sc}体内分布

PMCA産物を希釈・再増幅を繰り返す連続PMCAにより、輸血サルにおけるPrP^{Sc}の組織分布について60あまりの組織を網羅的に解析した。その結果、頭頂葉髄質、脊髄頸部神経根、座骨神経、鼠径リンパ節からPrP^{Sc}が検出された(図1)。したがってこのサルでは感染が成立しており、PrP^{Sc}はすでに中枢に到達していたと考えられる。鼠径リンパ節(3倍濃縮)、座骨神経(100倍濃縮)および頭頂葉髄質(40倍濃縮)では、4ラウンド以降、PrP^{res}シグナルが明瞭になり1/2が陽性になった。PrP^{Sc}量はいずれもBSE感染脳乳剤の 10^{-10} ~ 10^{-9} 希釈に相当するが、濃縮倍率を考慮するとPrP^{Sc}量は鼠径リンパ節>頭頂葉髄質>座骨神経と推定される。8ラウンドまで増幅を延長すると、脊髄頸部神経根(10倍濃縮)の1/2が陽性になった。

2) 尿中PrP^{Sc}の検出

経口投与未発症サル(#006、深頸リンパ節、延髄、脾臓、血漿、回腸からPrP^{Sc}を検出)の解剖時に採取した体液類を濃縮し、PMCA解析したところ、尿から4ラウンド以降、1/2が陽性になった(図2)。濃縮サンプルのPrP^{Sc}量は、感染脳乳剤の 10^{-10} ~ 10^{-9} 希釈に相当するが、尿中には 10^{-12} ~ 10^{-11} に相当するPrP^{Sc}が排泄されていたと推定される。

3) 非定型BSE感染サル由来PrP^{Sc}の増幅

ヒトPrP^{Sc}のPMCA増幅に有効であると報告されたヘパリンを添加し、マルチステップPMCAで増幅した結果、 10^{-3} 希釈サンプルから典型的なPrP^{res}シグナルを検出した。しかしながら 10^{-4} 以下の希釈サンプルからは5ラウンドの連続PMCAを行ってもPrP^{Sc}の増幅はほとんど認められなかった。

D. 考察

輸血感染モデルでは、BSE感染牛脳乳剤を脳内接種後、発症したカニクイザル(#007)の血液20mlを#013サルに輸血した。#007サルでは白血球分画(血液1.5mlから分取)からPrP^{Sc}が検出されている。PrP^{Sc}量は、連続PMCAにより陽性になるまでのラウンド数および陽性率から感染脳乳剤の 10^{-12} ~ 10^{-11} 希釈に相当すると推定された。輸血に用いた血液に含まれる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、超高感度検出法を用いても検出は難しいと予想された。

したがって、本研究では組織乳剤や体液をPTA沈殿法により濃縮後、連続PMCAにより解析を行った。その結果、鼠径リンパ節、頭頂葉髄質、座骨神経および脊髄頸部神経根から、PrP^{Sc}を検出した。大腿静脈に投与されたPrP^{Sc}は血流に乗り鼠径リンパ節へ移動したのち増幅され、末梢神経を介して中枢神経系へ伝達された可能性がある。

また定型BSEを経口投与後、7.5年を経過して未発症であった#006サルの解剖時に採取した尿からはPrP^{Sc}は検出されなかったが、PTA沈殿法による濃縮後、PrP^{Sc}を検出した。このサルでは、血漿サンプルからPrP^{Sc}が検出されたことを昨年度報告したが、診断材料として尿も有用である可能性が示唆された。

経口接種サル、輸血サルは現在まで発症に至ら

ず、これまで試験的に解剖した未発症サル各一例を解析できたにすぎない。現在経過観察中のサルは、解剖した個体と同様、感染はしているが無症候状態にとどまっている可能性が考えられる。次年度はこれらサルから定期的に採材されている血液（血漿、血清、白血球）、脳脊髄液、尿、唾液等を PMCA 解析し、PrP^{Sc} 検出性を経時的に解析する予定である。

非定型 BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の増幅条件を検討した結果、PMCA 増幅が可能になった。しかしながら連続 PMCA による検出感度の改善は5ラウンドまでほとんど認められなかった。次年度は、超高感度検出を可能にすべく増幅効率のさらなる改善を図り、非定型 BSE 接種サルにおける PrP^{Sc} の体内分布および動態の解析を目指す。

E. 結論

PTA 沈殿により濃縮したサンプルの連続 PMCA 解析により、輸血サルの末梢組織から PrP^{Sc} を検出した。このサルでは中枢神経系にも PrP^{Sc} が認められ、輸血によるプリオンの伝達を霊長類ではじめて実証した。また早期診断材料として、血漿に加えて尿も有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murayama, Y., Imamura, M., Masujin, K., Shimozaki, N., Yoshioka, M., Mohri, S. and Yokoyama, T. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein derived from ARQ and AHQ homozygote sheep by interspecies in vitro amplification. *Microbiol. Immunol.*, 56(8):541-547, 2012
- 2) Okada, H., Murayama, Y., Shimozaki, N., Yoshioka, M., Masujin, K., Imamura, M., Iwamaru, Y., Matsuura, Y., Miyazawa, K., Fukuda, S., Yokoyama, T. and Mohri, S. Prion in saliva of bovine spongiform encephalopathy-infected cattle. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(12): 2091-2092, 2012
- 3) Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Murayama, Y.,

Okada, H., Imamura, M., Shimizu, Y., Hashimoto, M., Mohri, S., Yokoyama, T. and Kitani, H. Anti-prion activity of brilliant blue G. *PLoS One* 7(5): e37896, 2012

- 4) Matsuura, Y., Ishikawa, Y., Bu, X., Murayama, Y., Yokoyama, T., Somerville, R.A., Kitamoto, T. and Mohri, S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.

2. 学会発表

- 1) 村山裕一. プリオンの超高感度検出とその応用. 先端医療振興財団・臨床研究情報センター定期研修会(2012年6月20日、神戸)
- 2) 村山裕一. BSE 異常プリオン蛋白質の超高感度検出技術の開発と体内分布. 平成24年度食肉・食鳥肉衛生技術研修会(2012年9月5日、札幌)
- 3) Imumara, M., Kato, N., Yoshioka, M., Okada, H., Iwamaru, Y., Shimizu, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. and Murayama, Y. Proteinase K- and heat-treated insect cell lysate effectively stimulates in vitro high-fidelity replication of baculovirus-derived recombinant scrapie and BSE prions. *Asian Pacific Prion Symposium 2012* (July, 29-30, 2012, Yokohama, Japan)
- 4) Fukuda, S., Fujii, T., Kageyama, S., Okada, H., Yokoyama, T. and Murayama, Y. Preclinical detection of PrP^{Sc} in eyes of BSE-affected cattle. *Asian Pacific Prion Symposium 2012* (July, 29-30, 2012, Yokohama, Japan)
- 5) 今村守一, 加藤紳子, 岩丸祥史, 横山隆, 村山裕一, 毛利資郎. 自己切断性精製タグシステムを用いた異常型構造への試験管内変換能を維持したバキュロウイルス由来組換えプリオン蛋白質の高純度精製法の確立. 第35回日本分子生物学会年会(2012年12月11~14日、福岡)
- 6) 岡田洋之, 村山裕一, 下寄紀子, 山村友昭, 吉岡都, 舛甚賢太郎, 今村守一, 岩丸祥史, 松浦裕一, 宮澤光太郎, 福田茂夫, 横山隆, 毛利資郎. 唾液プリオンを指標とした BSE 生前診断法の可能性. 第155回日本獣医学会学術集会(2013年3月28~30日、東京)