

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

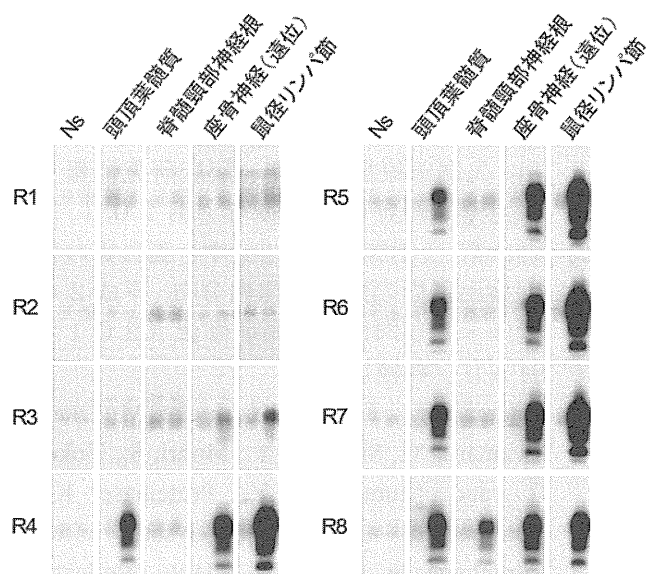


図1 輸血・未発症サル(#013)における PrP^{Sc} 検出
64 の組織・体液中、頭頂葉髄質・脊髄頭部神経根・座骨神経・鼠径リンパ節から PrP^{Sc} を検出した。

Ns: シードなしコントロール

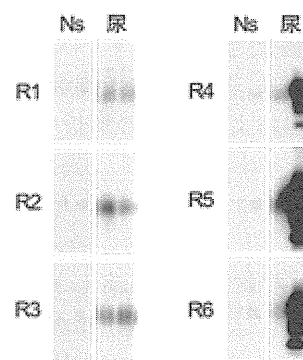


図2 経口感染・未発症サル(#006)の尿中 PrP^{Sc} の検出

解剖時に採取した尿サンプルから PrP^{Sc} を検出した。

12. 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 領域長補佐
研究協力者 岡田洋之、舛甚賢太郎（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^{Sc})の蓄積は、ほぼ中枢神経系に限局している。同様の病態を示す実験動物モデルの作出をめざして、BSE プリオンを接種したハムスターの病態を解析した。脳内接種したハムスターは約 270 日で発症し、脳内に PrP^{Sc} の蓄積が認められたが、脾臓から PrP^{Sc} は検出されなかった。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^{Sc} が検出されたが、脾臓からの PrP^{Sc} の検出は少数で、蓄積量も少量であった。しかし、経口投与では、BSE プリオンのハムスターへの伝達は認められなかった。

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^{Sc})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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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に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^{Sc} の蓄積が認められたが、脾臓からは PrP^{Sc} 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^{Sc} が検出されたが、脾臓での PrP^{Sc} の蓄積は少数例であった。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、脳及び脾臓から PrP^{Sc} 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^{Sc} の蓄積は、個体によって様々であり、PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} の分布は、すべての個体で類似していた。

3) BSE を経口投与したハムスターを約 600 日まで観察したが、感染は認められていない。一方、

Sc237 を経口投与したハムスターは約 180 日の潜伏期で感染が認められた。

D. 考察

BSE プリオンを伝播したハムスターでは、スクレイパー株に比べて長い潜伏期で伝達が成立した。脾臓（リンパ組織）における PrP^{Sc} の蓄積は低率であった。末梢組織での PrP^{Sc} の蓄積効率が経口感染の成立に関与する可能性が示唆された。

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が、経口感染の成立は認められなかった。一方、Sc237 株は脳内、腹腔内、経口のいずれの経路でも感染が成立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. *Prion*. 7(2) 1-7, 2013.
- 2) Okada H, Murayama Y, Shimozaki N, Yoshioka M, Masujin K, Imamura M, Iwamaru Y, Matsuura Y, Miyazawa K, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Prion in saliva of bovine spongiform encephalopathy-infected cattle. *Emerg Infect Dis*. 18(12):2091-2, 2012.
- 3) Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Kimura K, Mohri S, Yokoyama T. Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *J Vet Med Sci*. 74(9):1207-10, 2012.
- 4) Kim HJ, Tark DS, Lee YH, Kim MJ, Lee WY, Cho IS, Sohn HJ, Yokoyama T. Establishment of a cell line persistently infected with chronic wasting disease prions. *J Vet Med Sci*. 74(10):1377-80, 2012.
- 5) Tang Y, Gielbert A, Jacobs JG, Baron T, Andreoletti O, Yokoyama T, Langeveld JP, Sauer MJ. All major prion types recognised by a multiplex immunofluorometric assay for disease screening and confirmation in sheep. *J*

Immunol Methods. 29;380(1-2):30-9, 2012.

- 6) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. *Prion* 6(1):89-93, 2012.
- 7) 横山隆、辻智香、横山真弓 ニホンジカのプリオン病(CWD)サーベイランス *JVM* 65(6), 479-81, 2012.

2. 学会発表

- 1) K. Masujin, R. Miwa, H. Okada, S. Mohri, T. Yokoyama. Comparative analysis of Japanese and other countries L-type BSE prions. *Prion* 2012, Amstrdam, May 10-12, 2012.
- 2) J. Jacobs, J. Langeveld, T. Yokoyama, O. Andreoletti, J. Hope, A. Bossers, L. van Keulen, T. Baron. Ovine field CH1641 like scrapie cases do differ from classical scrapie and BSE–Western blotting studies on PrPres. *Prion* 2012, Amstrdam, May 10-12, 2012.
- 3) T. Yokoyama, G. Dorj, H. Okada, K. Miyazawa, K. Masujin, S. Mohri. Western blotting detection of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues–Immunoreactivity of mab discriminate sheep scrapie types. *Prion* 2012, Amstrdam, May 10-12, 2012.
- 4) T. Yokoyama Atypical bovine spongiform encephalopathies. The 16th Annual meeting of Japanese society for neurovirology. Tokyo, August 30-31, 2012.
- 5) M. Imamura, N. Kato, M. Yoshioka, H. Okada, Y. Iwamaru, Y. Shimizu, S. Mohri, T. Yokoyama, Y. Murayama. 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 (APPS 2012)*. Yokohama, July 29-30, 2012.
- 6) Y. Iwamaru, T. Takenouchi, M. Imamura, S. Mohri, T. Yokoyama, H. Kitani. Prion-mediated cytotoxicity in a differentiated neurosphere culture. *Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS 2012)*. Yokohama, July 29-30, 2012.
- 7) M. Kuroda, J. Kono, Y. Sato, T. Ohashi, T. Yokoyama, Y. Ushiki, T. Onodera, M. Yukawa. Application of micro-ELISA for detection of prion protein from small volume of sample. *Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS 2012)*. Yokohama, July 29-30, 2012.
- 8) K. Kasai, A. Hirata, T. Ohshima, K. Nokihara, T. Yokoyama, S. Mohri. Novel assay with fluorescence-labelled PrP peptides for differentiating L-type atypical and classical BSEs, and scrapie. *Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS 2012)*. Yokohama, July 29-30, 2012.
- 9) G. Dorj, H. Okada, K. Miyazawa, K. Masujin, S.

- Mohri, T. Yokoyama. Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS 2012). Yokohama, July 29-30, 2012.
- 10) Y. Nagasawa, Y. Takahashi, T. Hondo, H. Watanabe, S. Terada, C. Saito, S. Someya, K. Watanabe, S. Ohwada, H. Kitazawa, M. Imamura, T. Yokoyama, S. Sakaguchi, N. Nishida, S. Mohri, H. Aso. Prion protein binding proteins of bovine intestine M cell. Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS 2012). Yokohama, July 29-30, 2012.
- 11) S. Fukuda, T. Fujii, S. Kageyama, H. Okada, T. Yokoyama, Y. Murayama. Preclinical detection of PrP^{Sc} in eyes of BSE-affected cattle. Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS 2012). Yokohama, July 29-30, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

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 |
|-----------|------------------|-------------|-------------------------|-------|-----|------|-----------|
| 新竜一郎、西田教行 | プリオン病診断法の開発 | 千海俊幸 | 最新医学 | 最新医学社 | 大阪 | 2012 | 2572-2576 |
| 坂口末廣 | 44 章スローウイルスとプリオン | 吉開泰信 / 西山幸廣 | レビンソン微生物学・免疫学 [原書 11 版] | 丸善出版 | 東京 | 2012 | 321-325 |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

雑誌

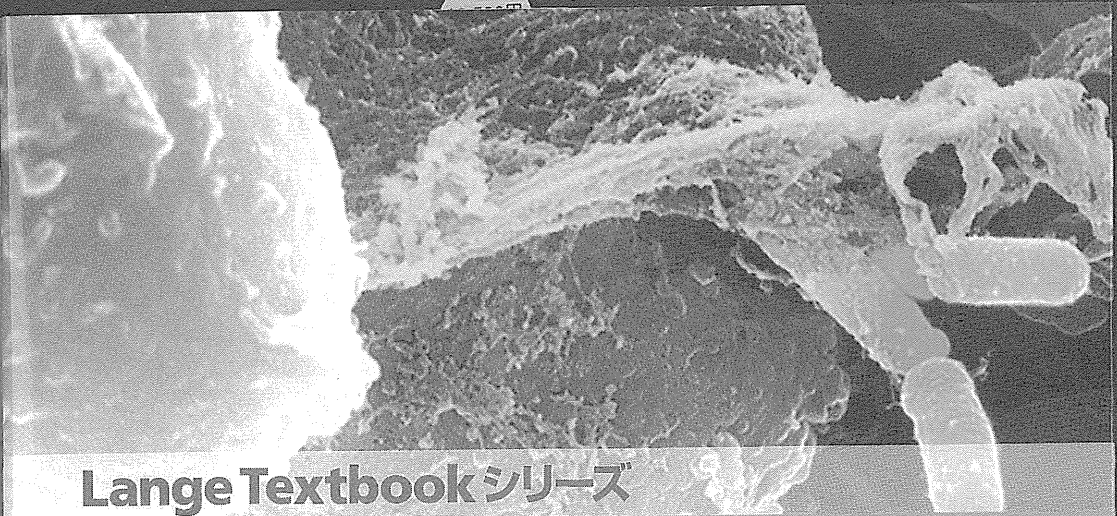
| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|----------------------|--------|------------|----------|
| Hasebe, R., Raymond, G. J., Horiuchi, M., and Caughey, B. | Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. | Virology | 423, | 205-213 | 2012 |
| Yoshikawa, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Kadohira, M., Kai, S., Mizusawa, H., Nagata, C., Onodera, T., Sata, T., Tsutsui, T., Yamada, M., and Yamamoto, S. | Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. | J. Vet. Med. Sci. | 74(8) | 959-968 | 2012 |
| Nakato G., Hase K., Suzuki M., Kimura M., Ato M., Hanazato M., Tobiume M, Horiuchi M., Atarashi R., Nishida N., Watarai M., Imaoka K. and Ohno H. | Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. | J Immunol. | 189(4) | 1540-15444 | 2012 |
| Ohsawa, N., Song, C.-H., Suzuki, A., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M. | Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. | Microbiol. Immunol. | | | in press |
| 山崎剛士、堀内基広 | プリオンの感染と細胞内動態 | Dementia Japan | | | in press |
| Sano K., Satoh K., Atarashi R., Takashima H., Iwasaki Y., Yoshida M., Sanjo N., Murai H., Mizusawa H., Schmitz M., Zerr I., Kim YS. and Nishida N. | Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. | PLoS One. | 8(1) | e54915 | 2013 |
| Ishibashi D., Atarashi R. and Nishida N. | Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. | Prion. | 6(5) | 443-446 | 2012 |
| Ishibashi D., Atarashi R., Fuse T., Nakagaki T., Yamaguchi N., Satoh K., Honda K. and Nishida N. | Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection. | J Virol. | 86(9) | 4947-4955 | 2012 |
| Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T | Enhanced antigen retrieval of amyloid β immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid β pathology in Alzheimer disease and its mouse model | J Histochem Cytochem | 60 | 761-769 | 2012 |

| | | | | | |
|--|--|----------------|---------|-------------|----------|
| Takeda N, Yokota O, Terada S, Haraguchi T, Nobukuni K, Mizuki R, Honda H, Yoshida H, Kishimoto Y, Oshima E, Ishizu H, Satoh K, Kitamoto T, Ihara Y, Uchitomi Y | Creutzfeldt-Jakob disease with the M232R mutation in the prion protein gene in two cases showing different disease courses: A clinicopathological study | J Neurol Sci | 312 | 108-116 | 2012 |
| Iwasaki Y, Yokoi F, Tatsumi S, Mimuro M, Iwai K, Kitamoto T, Yoshida M | An autopsied case of Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene codon 232 and type 1+2 prion protein | Neuropathology | | | in press |
| Yamaguchi Y, Miyata H, Uchiyama K, Ootsuyama A, Inubushi S, Mori T, Muramatsu N, Katamine S, Sakaguchi S. | Biological and biochemical characterization of mice expressing prion protein devoid of the octapeptide repeat region after infection with prions. | PLoS ONE | 7(8) | e43540 | 2012 |
| Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. | Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in ScN2a cells de novo illuminated by human IgG1 antibody recognizing β -form but not α -form of prion protein. | J Biol Chem | 287(17) | 14023-14039 | 2012 |
| 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 | 32(2) | 124-132 | 2012 |
| 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 PrPC to PrPSc in prion-infected neuroblastoma cells. | J. Virol. | 86 | 5626-5636 | 2012 |
| 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 |
| 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 |
| Okada, H., Iwamaru, Y., Kakizaki, M., Masujin, K., Imamura, M., Fukuda, S., Matsuura, | Properties of L-type bovine spongiform encephalopathy in intraspecies passages. | Vet Pathol | 49(5) | 819-823 | 2012 |

| | | | | | |
|---|---|---------------------|--------------|-----------|------|
| Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Mohri, S. and Yokoyama, T. | | | | | |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| Hasegawa K, Mohri S, and Yokoyama T. | Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. | Prion | 7(2) | 1-7 | 2013 |
| Dorj G, Okada H, Miyazawa K, Masujin K, Kimura K, Mohri S, and Yokoyama T. | Retrospective analysis of sheep scrapie by western blotting with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. | J Vet Med Sci. | 74(9) | 1207-10 | 2012 |
| Kim HJ, Tark DS, Lee YH, Kim MJ, Lee WY, Cho IS, Sohn HJ, and Yokoyama T. | Establishment of a cell line persistently infected with chronic wasting disease prions. | J Vet Med Sci. | 74(10) | 1377-80 | 2012 |
| Tang Y, Gielbert A, Jacobs JG, Baron T, Andreoletti O, Yokoyama T, Langeveld JP, and Sauer MJ. | All major prion types recognised by a multiplex immunofluorometric assay for disease screening and confirmation in sheep. | J Immunol Methods. | 29;380 (1-2) | 30-9 | 2012 |
| Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. | Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. | Prion | 6(1) | 89-93 | 2012 |

IV. 研究成果の刊行物・別刷

定價
1,800円



Lange Textbook シリーズ

レビンソン 微生物学・免疫学

[原書11版]

Review of
Medical Microbiology
and Immunology

11th edition

Warren Levinson

吉開 泰信 [監訳]
西山 幸廣

| | | |
|--------|--------|--------|
| 磯村 寛樹 | 後藤 敏 | 濱野 真二郎 |
| 伊藤 嘉規 | 坂口 末廣 | 原 田 守 |
| 今吉 理恵子 | 坂口 剛正 | 久 枝 一 |
| 江本 正志 | 柴田 健輔 | 廣松 賢治 |
| 大原 直也 | 菟浦池 健夫 | 藤本 秀士 |
| 金田 次弘 | 竹 上 勉 | 松崎 吾朗 |
| 上西 秀則 | 谷口 孝喜 | 水之江 義充 |
| 川田 潤一 | 谷口 初美 | 宮本 比呂志 |
| 河村 伊久雄 | 長 環 | 村田 貴之 |
| 神 田 輝 | 鶴見 達也 | 山田 久方 |
| 岸原 健二 | 永尾 潤一 | 波邊 綱正 |
| 木 村 宏 | 中村 梨沙 | 渡邊 [訳] |
| 五 島 典 | 中山 浩次 | |

LANGE

丸善出版

44

スローウイルスと
プリオン

9 ページを参照
している。

医師資格

題は、第 12 部の
18 ページ)。もし
練習問題を参

「遅発性」感染症は、ウイルスあるいはプリオンのようにウイルスではない非通常型の感染性因子からなるさまざまな病原体により起こる。プリオンは検出可能な核酸をもたないタンパク質粒子であり、ウイルスを不活化する量の熱やフォルムアルデヒドおよび紫外線に耐性である。プリオンは通常の料理の温度に耐性である。このことは、プリオンが食料を介して感染できるかもしれないということによって重要である(下記の変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 variant Creutzfeldt-Jakob disease[vCJD]を参照)。しかし、プリオンはフェノール、エーテル、水酸化ナトリウムや次亜塩素酸塩などのようなタンパク質や脂質を破壊するような薬剤で不活化される(28 章参照)。

プリオンタンパク質 prion protein(PrP)は正常細胞の遺伝子にコードされ、神経細胞のシグナル伝達経路において機能していると考えられている。正常プリオンタンパク質(PrP^Cと略される、^Cは細胞性[cellular]を意味する)は α ヘリックス構造に富んでいる。 α ヘリックス構造が β シート構造に変化すると異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc}と略される、^{Sc}はスクレイピー[scrapie]を意味する)に変化し、線維状の凝集体を形成する。それらは神経細胞の機能を破壊し細胞死を起こす。プリオンは異常プリオンタンパク質が正常プリオンタンパク質の構造を変化させることによって「繁殖する」。正常プリオンタンパク質と異常プリオンタンパク質は同一のアミノ酸配列を有する。両者の異なる点は唯一構造のみである。細胞の RNA はこの構造変化を促進する。プリオンの詳細は 28 章を参照。

ヒトでは、「遅発性」病原体は中枢神経系 central nervous system の病気を起こす。これらの病気は、潜伏期が長く、緩徐に発症し、死の経過をたどる。抗生物質は効かない。「遅発性」という用語は、病態を意味しているのであって、このような病気を起こすウイルスの複製が遅いということの意味していない。このような病気のウイルスの複製の速さは、ほかの多くのウイルスの複製の速さと同様である。

クールーや CJD のようなプリオンで起こるヒトの病気は、伝達性海綿状脳症 transmissible spongiform encephalopathy (TSE) とよばれる。「海綿状」と

いう用語は、神経細胞の死によって生ずる脳実質のスポンジ状の、スイスチーズ様の穴を意味する(図 44-1)。患者の脳内にはウイルス粒子はみられない。

「脳症」という用語は、炎症のない脳の病理学的変化を示す。反対に、「脳炎」とは白血球やリンパ球のどちらかが存在する炎症性の脳変化を示す。伝達性海綿状脳症では、脳に炎症性変化はない。

当初、クールーや CJD の病原体(「プリオン」)の伝達性は、感染した患者の脳を霊長類の脳内に接種し、さらにそれをほかの霊長類の脳内に接種することにより立証された。

しかし、クールーと変異型 CJD(それにウシ海綿状脳症 bovine spongiform encephalopathy[BSE]または狂牛病)は経口摂取によって起こる。この感染経路では、プリオンは消化管での消化を耐え、その後消化管粘膜を通過していくに違いない。そして、プリオンはパイエル板などのリンパ組織に存在する濾胞樹状細胞で増殖する。その後、プリオンは移動性樹状細胞によって脾臓に広がる。脾臓からは、プリオンは交感神経系を介して中枢神経系に広がる。

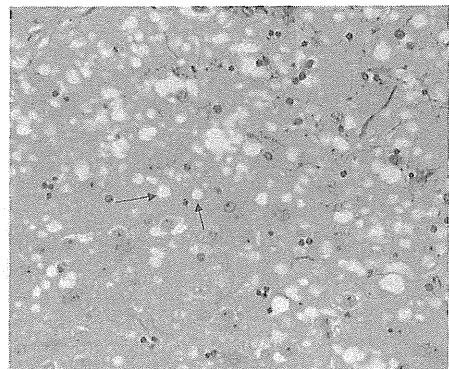


図 44-1 プリオンによる海綿状脳症(狂牛病)——2つの矢印は狂牛病のウシの脳の実質の状態(スイスチーズ様の空胞)を指している。クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の患者の脳にも同様な所見がみられる。(Dr. Al Jenny, Public Health Image Library, CDC. より許可を得て転載)

また、輸血で感染したCJDのケースが報告されているので、プリオンはリンパ球に入ったまま脳に達するのかもしれない。さらに、CJDは角膜移植、硬膜移植、脳内電極、ヒトの下垂体から抽出された成長ホルモンを介して、医原性 iatrogenically に伝達することも知られている。

キナクリンやほかのアクリジン類似体が培養細胞の異常プリオンタンパク質の産生を抑制する。これらの薬剤は動物モデルを用いて、プリオン病を治療または抑制できるのが現在テストされている。

プリオンが起す病気は3つのカテゴリーに分類される。クールーのように明らかに伝達性(感染性) transmissible(infectious)のもの、致死性家族性不眠症のように明らかに遺伝性 hereditary(genetic)のもの、ほとんどのCJDケースのように孤発性 sporadic(感染性でも遺伝性でもない)のものがある。孤発性のケースは自然発生の体細胞突然変異によるのかもしれない。

通常ウイルスによる遅発性疾患

進行性多巣性白質脳症

進行性多巣性白質脳症 progressive multifocal leukoencephalopathy(PML)は致死性の脳白質の脱髄性疾患(白質脳症)で、多くの部位が侵される(多巣)。脳内には炎症所見がないので、脳炎ではない。

臨床的特徴は視野欠損、精神状態変化、脱力である。病気は急激に進行し、失明、痴呆、昏睡に至る。ほとんどの患者は6カ月以内に死に至る。この病気はおもに細胞性免疫不全のヒトに起こる。特に、エイズ患者や抗癌剤治療を受けている患者や臓器移植後に免疫抑制剤を服用している患者に多い。モノクローナル抗体ナタリズマブで多発性硬化症の治療を受けている患者もこの病気を起こすことがある。また、移植の拒絶反応を抑制するためにミコフェノール酸を服用しているヒトもこの病気を起こす。表44-1に、通常ウイルスで起こるヒトの遅発性ウイルス感染症の特徴を記す。

進行性多巣性白質脳症は、ポリオーマウイルス科の仲間であるJCウイルスにより起こる。ポリオーマウイルスは非エンベロープウイルスで、環状の二本鎖DNAをゲノムとする。JCウイルスはオリゴデンドログリアに感染し、細胞死に至らしめ、脱髄を引き起こす。神経細胞は冒されない。JCウイルスに対する抗体が正常人の約75%の血清中にも検出される。このことは、JCウイルス感染が蔓延していることを示している。潜伏感染しているJCウイルスが免疫不全患者で活性化されると、発症する。ウイルスは腎臓に持続感染し、尿中に排泄される。診断は、脳生検材料や脊髄液のポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction(PCR)によって行われる。

亜急性硬化性全脳炎

亜急性硬化性全脳炎 subacute sclerosing panencephalitis(SSPE)は緩徐に進行し、脳の多くの領域に炎症所見を認める疾患である。この病気は、子供のまれな病気で、数年前に麻疹ウイルス measles virus に感染した子供 children に起こる。亜急性硬化性全脳炎は軽度の性格変化から始まり、痴呆や死に至る。

亜急性硬化性全脳炎は複製できない変異麻疹ウイルスの持続感染である。この証拠を下記にあげる：

- (1) 抗麻疹ウイルス抗体と反応するらせん状のヌクレオカプシドを含む封入体が病気の神経細胞の中に見られる。
 - (2) 病気の神経細胞を許容細胞と共培養すると、麻疹ウイルス類似のウイルスが誘導される。これらのウイルスは異なるマトリックスタンパク質を有する。このタンパク質はウイルス粒子の組立てに重要である。
 - (3) 患者の血中および脊髄液中には高力価の抗麻疹ウイルス抗体が存在する。
 - (4) 亜急性硬化性全脳炎は麻疹ワクチンを広範囲で行って以来、米国では事実上消滅した。
- 進行性全脳炎は先天性風疹の患者にも起こる。

後天性免疫不全症候群

エイズ acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)

表 44-1 通常ウイルスによる遅発性ウイルス感染症の重要な特徴

| 疾患 | ウイルス | ウイルス科 | 特徴 |
|------------------|-----------------|-----------|-------------------------------|
| 進行性多巣性白質脳症 | JCウイルス | パポバウイルス | 蔓延する感染；免疫不全者のみに起こる病気 |
| 亜急性硬化性全脳炎 | 麻疹ウイルス | パラミクソウイルス | 脳内の欠陥ウイルスを保有する幼児に起こる病気 |
| 後天性免疫不全症候群(AIDS) | ヒト免疫不全ウイルス(HIV) | レトロウイルス | HIVはCD4陽性細胞(たとえば、脳マクロファージ)に感染 |

オーマウイルス科の
ころ、ポリオーマウ
で、環状の二本鎖
スはオリゴデンドロ
め、脱髄を引き起
：ウイルスに対する
も検出される。こ
Eしていることを示
ウイルスが免疫不全
ウイルスは腎臓に
診断は、脳生検材料
polymerase chain

sclerosing panen-
脳の多くの領域に
の病気は、子供のま
s measles virus に
重急性硬化性全脳
筋呆や死に至る。
ない変異麻疹ウイル
下記にあげる：
するらせん状のスク
気の神経細胞の中
と共培養すると、麻
痺される。これらの
タンパク質を有す
並子の組立てに重要
こは高力価の抗麻疹
フクチンを広範囲で
成した。
皆にも起こる。

y syndrome(AIDS)

感染：免疫不全者のみ
弱
弱ウイルスを保有する
る病気
陽性細胞(たとえ
プロフェーシ)に感染

表 44-2 プリオンによる遅発性ウイルス感染症の重要な特徴

| 疾患 | 病態 | 特徴 |
|--------------------------|--------------------------------|--|
| クールー | 伝達性/感染性 | 経口摂取または脳組織を取り扱うことで感染；ニューギニアの種族に発症 |
| クロイツフェルト・ヤコブ病 | 1. 伝達性/感染性 2. 遺伝性 3. 孤発性 | 角膜移植、脳内電極、および成長ホルモンによる医原性感染 胚細胞の突然変異 既知の原因と関係ない；体細胞の突然変異の可能性あり；最多の病型 |
| 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 | 伝達性/感染性 | おそらく狂牛病のウシの牛肉または神経組織を摂取して起こる |
| ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 | 遺伝性 | 胚細胞の突然変異 |
| 致死性家族性不眠症 | 遺伝性 | 胚細胞の突然変異 |

はレトロウイルスのレンチウイルスグループの仲間であるヒト免疫不全ウイルス human immunodeficiency virus(HIV)によって起こる。エイズは長い潜伏期と進行性の特徴とする病気で、中枢神経系も冒される。詳細は45章参照。

プリオンによる遅発性感染症

ヒトにはプリオン prion によって起こる5つの伝達性海綿状脳症がある。それらは、クールー、CJD、変異型 CJD、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー (GSS) 症候群、と致死性家族性不眠症である。表 44-2 に、プリオンによって起こるヒトの遅発性ウイルス感染症のおもな特徴をまとめている。

クールー

この致死性の病気は進行性の振戦と運動失調を特徴とするが、痴呆はない。この病気は、ニューギニアのフォア族 Fore tribe in New Guinea にのみ起こる。この病気は、死者の頭蓋骨を開け、脳を食べる儀式の間に伝達する。2つの経路でこの病気は感染すると考えられる。1つは脳を食べること、もう1つは脳を調理しているときにできた皮膚の傷を介して脳組織が体内に侵入すること。この儀式が中止になって以来、クールーはほとんどなくなった。クールーや CJD(下記参照)の病原体は霊長類に継続的に伝達されてきた。

クロイツフェルト・ヤコブ病

クールーや CJD の患者の脳を病理学的に調べると、ヒツジのスクレイピー (下記参照) に認められる海綿状(スポンジまたはスイスチーズ)変化と似た所見が認められる。この海綿状変化は脱髄により起こっているというよりも、神経細胞の空胞化および神経細胞の脱落により起こっている。炎症性細胞は脳内にみられない。スクレイピーを引き起こすプリオンは、CJD 患

者の脳内にも検出されている。

クールーと異なり、CJD は世界中に散発的にみられ、男も女も同様に発症する。CJD の発生率はおよそ 100 万人に 1 人である。感染の危険性は食習慣、職業、動物への曝露歴で増加しない。肉食主義者と肉食者では、同じ発生率である。CJD の発生率は、スクレイピーの発生した国および発生しなかった国で同じである。ヒトからヒトへの感染および経胎盤感染の証拠はない。

医療介護者だからといって、危険性は増加しない。そのため、ガウンやマスクは必要ではない。感染性の材料を取り扱うときには標準的な注意が必要となる。CJD は医原性に感染する。たとえば、角膜移植、脳内電極、ヒトの下垂体から抽出されたホルモン、死体硬膜の移植片を介して感染する。輸血で感染した CJD が 1 例のみある。静注薬物使用により、感染の危険性は増加しない。CJD 病原体で汚染したものを適切に消毒するには、オートクレーブと水酸化ナトリウム処理がある。

CJD のおもな臨床的所見は、痴呆(行動変化、記憶消失、精神錯乱を含む)とミオクローヌス性発作がある。ほかの所見として、運動失調、失語、失明、片麻痺がある。典型的には、症状は緩徐に出現し、容赦なく進行する。終末期には、患者は無言無動になる。患者の約 80% が 1 年以内に死ぬ。ほとんどのケースは、50~70 歳のヒトに起こる。

CJD の診断は、脳の生検材料に海綿状変化を病理学的に検出して行われる。神経脱落とグリオシスが認められる。アミロイド斑が認められるケースもある：変異型 CJD では、空胞がハロー状に周囲を取り囲んでいる花弁状アミロイド斑(フローリド斑)がみられる。特徴的脳画像や脳波の変化がみられることもある。炎症の所見はない。白血球やリンパ球はみられない。血球検査や所定の髄液検査は正常である。髄液中の 14-3-3 タンパクとよばれる脳内タンパク質は診断

の補助となる。

CJDの確定診断は、典型的には、患者の脳組織材料を抗プリオン抗体で染色する免疫組織化学によってなされる。ヒトはプリオンタンパク質に対する抗体を産生しないので、血清学的検査による診断はできない。ヒトは自身のプリオンタンパク質に免疫的に寛容であるから、ヒトでは抗体が産生されない(免疫組織化学検査に使用する抗体はヒトプリオンが免疫原性であるほかの動物から作成されている)。ウイルスと違い、プリオンは培養で増殖しない。したがって、培養による診断検査はない。

変異型CJD患者の扁桃腺組織がモノクローナル抗体を用いたアッセイでプリオンタンパク質陽性であった。扁桃腺やほかの類似のリンパ組織を使えば、脳生検の必要性はなくなるかもしれない。病原性プリオンタンパク質は、CJD患者の嗅上皮にも検出されている。

CJDの治療法はない。薬剤もない。また、予防のためのワクチンもない。

CJDのほとんどのケースが孤発性であるが、約10%は遺伝性である。遺伝性(家族性)CJDは常染色体優性遺伝である。これらのケースでは、プリオンタンパク質遺伝子に12の点突然変異やいくつかの挿入変異がみついている。ヒトの遅発性中枢神経系疾患であるGSS症候群GSS syndromeの患者では、102番目のコドンに突然変異がみられる。GSSのおもな臨床的特徴は、小脳性運動失調と痙攣性麻痺である。遺伝性CJDはキャリアの発見と遺伝カウンセリングにより予防が可能かもしれない。

これらの海綿状脳症の病因は3つである。感染性infectious、遺伝性hereditary、および孤発性sporadicである。感染性はクールーとおそらく変異型CJD(下記参照)である。感染性病原体の伝播性はCJD患者の脳材料をチンパンジーに継続的に接種することにより証明されている。遺伝性は、上記で述べたように、GSS症候群と致死性家族性不眠症とよばれる病気がもっとも良い例である。「孤発性」という用語は、感染性と遺伝性が原因でない病気を意味している。

致死性家族性不眠症fatal familial insomniaは進行性の不眠、さまざまな症状を起こしている自律神経障害(自律神経系の機能障害)、痴呆、および死を特徴とする大変まれな疾患である。この病気の患者には、プリオンタンパク質の突然変異がある。

変異型クロイツフェルト・ヤコブ病

1996年に、英国で牛肉の摂取により数例のCJDが発生した。これらのケースはCJD(variant Creutzfeldt-Jakob disease[vCJD]ともよばれる)の新

しい変異型である。なぜなら、通常より大変若い人に起こり、典型的なCJDにみられる臨床病理学的所見が明らかに異なるからである。これらの患者はウシやヒツジの脳を食べたことはない。しかし、脳の材料がソーセージのような加工食肉に混じていたかもしれない。

プリオンタンパク質の129番目のアミノ酸がメチオニンのホモ接合体をもつヒトだけが、vCJDに罹っている。プリオンタンパク質の129番目のアミノ酸がバリンのホモ接合体をもつヒトやメチオンとバリンのヘテロ接合体をもつヒトはvCJDに罹っていない。これらの事実は、メチオンをもつプリオンタンパク質は病原性の β シート型により折り畳まれやすいことを示している。

vCJD患者のプリオンはほかのプリオンよりも狂牛病のプリオンに化学的に似ている。これは、vCJDが牛肉を食べたことによって起こったとする仮説を支持している。ヒツジの肉を食べたvCJDになったという証拠はない。2009年2月までに、209名のヒトがvCJDと診断されている。そのうち、165名は英国に在住している。3例のvCJDが米国で報告されている。そのうち、2例は英国で感染したと考えられている。すべてのvCJDのケースはBSEが検出された国に住んだことがあるか旅行したことがあるヒトに起こっている。

どれだけのヒトが、潜伏感染(無症状)の状態でも病原性プリオンを保有しているのか不明である。vCJDプリオンの無症候性キャリアのヒトや輸血を介してほかのヒトに感染のソースとなり得るヒトがいるかもしれないという可能性から、米国の血液バンクは6カ月間以上英国に在住したことのあるヒトを血液提供者から除外した。

動物の遅発性感染症

動物の遅発性伝達性疾患はヒトの病気の重要なモデルである。スクレイピーとビスナはヒツジの病気である。「狂牛病」(BSE)はヒツジの組織をウシが摂取したことから起こったと推定されるウシの病気である。慢性(伝達性)消耗病はシカやヘラジカに起こる。ビスナはウイルスによって起こる。スクレイピー、BSE、慢性(伝達性)消耗病はプリオンによる病気である。

スクレイピー

スクレイピーはヒツジの病気、振戦、運動失調、搔痒を特徴とし、ヒツジは柵に毛をこすりつける。何カ月もの長い潜伏期をもつ。病気の動物の脳組織には、炎症のない海綿状変性がみられる。ウイルス粒子

より大変若い人に臨床病理学的所見らの患者はウシやかし、脳の材料がっていたかもしれ

アミノ酸がメチオ、vCJDに罹って目のアミノ酸がパオンとバリンのへっていない。これンタンパク質は病やすいことを示し

リオンよりも狂牛これは、vCJDがことする仮説を支JDになったとい209名のヒトが、165名は英国に報告されている。考えられている。食出された国に住るヒトに起こって

状態)の状態で病原である。vCJDブ輸血を介してほかトがいるかもしれバンクは6カ月間を血液提供者から

病気の重要なモデルヒツジの病気である。ウシが摂取しシの病気である。カに起こる。ビスレイビー、BSE、る病気である。

振戦、運動失調、こすりつける。何動物の脳組織にる。ウイルス粒子

が確認できない脳抽出物を介して、マウスやほかの動物に伝達できる。マウスの研究から、感染性はプリオンとして知られる分子量27kDaのタンパク質と関連している(195ページ参照)。

ビスナ

ビスナは肺炎と脳の脱髄を特徴とするヒツジの病気である。レトロウイルス科に属するレンチウイルスの仲間であるビスナウイルスによって起こる。プリオンは、一本鎖の2倍体RNAゲノムとRNA依存性DNAポリメラーゼを有する。DNAプロウイルスが宿主細胞のDNAに組込まれることが、宿主内でのウイルスの持続感染に重要で、結果的に、長い潜伏期と長い進行性の経過をたどると考えられている。

ウシ海綿状脳症

ウシ海綿状脳症(BSE)は「狂牛病」としても知られている。ウシは攻撃的になり、運動失調になり、最終的に死ぬ。ウシは、スクレイビープリオンに感染したヒツジの臓器、たとえば脳などが加えられた餌を食べるBSEになる(BSEはプリオンタンパク質をコードする遺伝子に突然変異をもつウシに起こる可能性もある)。

BSEは英国に流行している。1988年に英国では、ヒツジの臓器を餌に加えることは禁止され、何千頭ものウシが処分された。こうして、BSEの新たなケースは著明に減少した。BSEは、フランス、ドイツ、イタリアやスペインなどのほかのヨーロッパの国々のウシにもみられた。これらの国々では、vCJDがヒトに出現するかもしれないと警戒されている。米国では

2例のBSEが報告されている。

慢性(伝達性)消耗性疾患

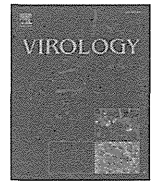
シカやヘラジカの慢性(伝達性)消耗病(CWD)は米国にみられるプリオンによる病気である。vCJDは牛肉の摂取により感染したと強く疑われているので、シカやヘラジカの肉(ベニスン)を食べたらどうなるのかについて懸念がある。2002年に、神経変性疾患が1990年代にシカの肉を食べた3人の男性に起こったことが報告された。1人は、CJDと確認されている。因果関係があるのか明らかでなく、経過観察が続けられている。これについての関心は、プリオンがCWDのシカの筋肉に検出されたが、正常なシカの筋肉からはみつからなかったことが明らかになった2006年に、高まった。

まとめ

本章で解説されているまとめは、519ページを参照。必要最低限の事項が簡潔に要約されている。

練習問題：USMLE(米国医師資格試験)と課程試験

本章で論じられた内容に関する問題は、第12部の米国医師資格試験練習問題を参照(568ページ)。もしくは第13部の米国医師資格試験実践的練習問題を参照(603ページ)。



Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo

Rie Hasebe ^{a,b,*}, Gregory J. Raymond ^a, Motohiro Horiuchi ^b, Byron Caughey ^a

^a Laboratory of Persistent Viral Diseases, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, 903 South 4th street, Hamilton, MT 59840, USA

^b Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Nishi 9, Kita 18, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2011
Returned to author for revision 21 September 2011
Accepted 21 November 2011
Available online 3 January 2012

Keywords:

Prion
Scrapie
Complement factors
Strain difference

ABSTRACT

Roles of complement factors in prion infection of the central nervous system remain unclear. In this study, we assessed the strain-dependent reactivity of complement factors in prion infections of Neuro2a (N2a) cells and mouse brains. N2a cells persistently infected with either Chandler or 22L scrapie strains were cultured in the presence of normal mouse serum (NMS), followed by staining with phosphatidylserine binding protein and early apoptosis marker Annexin V. The proportion of Annexin V positive cells was increased both in Chandler- and 22L-infected cells. Preincubation of NMS with anti-C1q, C3 and/or C9 antibodies reduced Annexin V positive cells in Chandler-infected cells, while only anti-C3 antibodies were effective on 22L-infected cells. The immunohistochemistry showed that deposition of C1q and C3 was different between Chandler- and 22L-infected mouse brains. These results indicate that the reactivity of complement factors differs between prion strains both in vitro and in vivo.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The complement system plays key roles in the immune system including regulation of immune reactions and the elimination of phagocytosed antigens, immune complexes, tumor cells and apoptotic cells. Complement factors also have multiple functions for synapse remodeling (Stevens et al., 2007), neurogenesis (Shinjyo et al., 2009), cell survival (Dashiell et al., 2000; Soane et al., 1999, 2001) and cell death (Ren et al., 2008). Complement factors also seem to be involved in pathogenesis of neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease (AD). Previous studies showed that β -amyloid, the major constituent of senile plaques, binds C1q and induces complement activation, which may promote either neuroprotection or neurotoxicity (Guan et al., 1994; Sarvari et al., 2003; Webster et al., 1997).

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders including scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy in cattle, chronic wasting disease in cervids and Creutzfeldt–Jakob disease in humans. These diseases are characterized in the central nervous system (CNS) by deposition of abnormal forms of prion protein (e.g. PrP^{Sc}), vacuolation of neural tissue, astrogliosis and microglial activation. Previous studies using C1q, factor B/C2 or C3 depleted mice (Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2001) have implicated the involvement of these complement factors in the spread of prions from peripheral tissues to CNS. Klein et al. (2001) and Zabel et al. (2007)

showed that complement receptor CD21/35 on follicular dendritic cells has an important role in lymphoid prion accumulation and neuroinvasion of prion. Flores-Langarica et al. (2009) demonstrated that C1q is involved in PrP^{Sc} uptake into conventional dendritic cells, which have an important role in the prion propagation from the peripheral tissue to the CNS. Direct binding of C1q to amyloid fibrils, beta-oligomers prepared from human or mouse recombinant PrP and purified PrP^{Sc}, resulting in activation of the classical complement pathway, has been demonstrated in vitro, suggesting that prion infection induces complement activation (Blanquet-Grossard et al., 2005; Dumestre-Perard et al., 2007; Erlich et al., 2010; Mitchell et al., 2007; Sim et al., 2007; Sjoberg et al., 2008).

Klein et al. (2001) and Mabbott et al. (2001) suggested that complement factors seem to be less important in the CNS than the periphery, because depletion of either C1q, factor B/C2 or C3 did not affect the survival period of mice intracerebrally infected with Chandler and ME7 scrapie. Mabbott and Bruce (2004) showed that the incubation periods of C5 deficient mice infected with ME7 and 79A scrapie via intracerebral or peripheral route were similar to those of wild type mice. However, there still remains the possibility that complement factors are involved in neuropathogenesis of prion diseases. Association of complement factors with amyloid plaques of human prion disease was demonstrated by immunohistochemistry (Ishii et al., 1984; Kovacs et al., 2004). mRNA levels of C1q and C3 increase in the brains of mice intracerebrally infected with Chandler, 22L or ME7 strains in the pre-clinical phase of the disease, indicating that expression of complement factors is altered in the early stage of the neuropathogenesis in some prion strains (Dandoy-Dron et al., 1998; Hwang et al., 2009; Skinner et al., 2006).

* Corresponding author at: Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Nishi 9, Kita 18, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan. Fax: +81 11 706 5293.

E-mail address: r-hasebe@vetmed.hokudai.ac.jp (R. Hasebe).

In this study, we have further assessed the possible involvement of complement factors in the neuropathogenesis of prion disease using murine neuroblastoma (N2a) cells and mice infected with Chandler and 22L scrapie strains. Our data suggest that complement factors induce translocation of phosphatidylserine in the plasma membrane of prion-infected N2a cells and that the reaction of complement components varies with prion strain.

Results

Normal mouse serum treatment induces degenerative change in scrapie-infected N2a cells

To assess the possibility that complement factors react on scrapie-infected cells, we used N2a cells persistently infected with Chandler or 22L strains. For uninfected negative controls, we cured the scrapie infection in these cell lines using pentosan polysulfate (PPS). The cells were treated with normal mouse serum (NMS), heat-inactivated NMS (H-NMS) or fetal bovine serum (FBS) for 6, 12, 24 and 48 h (Fig. 1). NMS contains almost all murine complement components, whereas these factors are inactivated in H-NMS and absent in FBS. After these treatments, the cells were stained with Annexin V, a protein that labels phosphatidylserine in the outer leaflet of the plasma membrane as a marker of an early stage of apoptosis (Koopman et al., 1994). Time dependent increases in Annexin V-positive cells were observed only in the cultures treated with NMS, culminating in much higher percentages of positive cells in the Chandler- and 22L-infected N2a cultures (60–64%) than in the PPS-cured cultures (14–18%). These results indicated that NMS treatment induced degenerative change in Chandler- and 22L-infected N2a cells to an extent that was enhanced ~4-fold by scrapie infection. Less than 10% of the cells treated with H-NMS and FBS were Annexin V positive, indicating that the NMS factors mediating the increase in Annexin V positivity were heat sensitive, as is known to be true for complement factors. Moreover, a similarly low percentage of FBS-treated cells was Annexin V-positive, indicating that bovine serum factors cannot be substituted for murine factors in mediating the observed degenerative changes. To assess if cell death occurs in these cells or not, the cells were incubated with propidium iodide (PI) at 24 h after NMS treatment (Fig. 1D). Although PI uptake was slightly increased in the Chandler- and 22L-infected N2a cells compared to PPS-cured cells, less than 10% of the cells were positive for PI, suggesting that translocation of phosphatidylserine hardly resulted in cell death.

Different complement factors are involved in NMS-induced degenerative changes in Chandler- and 22L-infected N2a cells

To further examine the role of murine complement factors in the NMS-induced degenerative changes in Chandler- and 22L-infected N2a cells, the NMS was pre-treated with anti-C1q, C3, C9 antibodies or mixture of these antibodies. Because all of the antibodies were derived from goats, we used normal goat serum (NGS) and anti-mouse IgG goat serum as controls. In Chandler-infected N2a (Fig. 2A), the pretreatment with individual anti-C1q, C3 or C9 antibodies reduced the proportion of Annexin V positive cells ($p < 0.01$ vs pretreatment with NGS or anti-mouse IgG, Student's *t* test). The mixtures of anti-C1q + C3 and anti-C1q + C3 + C9 were even more effective than the individual anti-C1q, C3 or C9 antibodies ($p < 0.01$, Student's *t* test), suggesting that multiple complement components are involved in the degeneration of Chandler-infected N2a cells. In contrast, in 22L-infected cells (Fig. 2B), the anti-C1q and anti-C9 antibodies were ineffective, while the anti-C3 antibody alone reduced the percentage of Annexin V positive cells as effectively as combinations of antibodies to C1q + C3, C3 + C9 and C1q + C3 + C9. These results suggested that only C3 was involved in the degenerative change of 22L-infected N2a cells. The involvement of multiple complement factors in the induction

of Annexin V positivity in Chandler-infected N2a cultures (Fig. 2A) raised the possibility that membrane attack complex (MAC) formation occurs on the plasma membrane on these cells. To assess this possibility, we performed immunocytochemistry for MAC on Chandler-, 22L-infected (Fig. 2C) or PPS-cured N2a cells (data not shown). In Chandler-infected N2a cells, MAC was detected at 24 h after treatment, suggesting that MAC formation occurred on Chandler-infected N2a cells, but not on 22L-infected and PPS-cured N2a cells.

C1q colocalizes with PrP in Chandler-infected N2a cells

To examine if C1q is associated with PrP in scrapie-infected or PPS-cured N2a cells after exposure to NMS, we performed double staining of C1q (green) and PrP (red) under non-denaturing condition (Fig. 3). In Chandler-infected N2a cells, colocalization of C1q with PrP (yellow) was detected at 30 min and 1 h. In 22L-infected cells, colocalization was not detected at any time point and C1q staining seemed localized in the cytoplasm more than on the cell surface. C1q staining was hardly detected in PPS-cured cells at any time point. No C1q staining was detected in untreated cells (data not shown). These results suggest that PrP on Chandler-infected N2a cells was associated with C1q on the cell surface.

C3 colocalizes with PrP in 22L-infected N2a cells

Next we analyzed the association of C3 with PrP in scrapie-infected or PPS-cured N2a cells (Fig. 4). In 22L-infected cells, colocalization of C3 and PrP was detected in the cytoplasm and on the cell surface at 15 and 30 min after NMS treatment. Although C3 staining was observed rarely in Chandler-infected or PPS-cured N2a cells, no colocalization was detected. No staining was detected in untreated cells (data not shown). These results suggest that PrP on 22L-infected N2a cells was associated with C3 on the cell surface and in the cytoplasm.

Distribution of C1q and C3 in scrapie-infected mouse brain

We also analyzed the distributions of vacuolar lesions, PrP^{Sc}, C1q and C3 in Chandler-, 22L- or mock-infected mouse brains (Figs. 5 & 6). At 90 dpi (pre-clinical stage of the disease) in Chandler-infected mouse brains, mild vacuolar degeneration was observed in the thalamus. PrP^{Sc} was strongly detected in the thalamus, moderately in secondary motor cortex and mildly in retrosplenial agranular cortex, septum, CA1 of hippocampus, midbrain, pons and medulla of the cerebellum. The C1q distribution was almost consistent with PrP^{Sc} except in the secondary motor cortex. Mild deposition of C3 was detected in cerebral cortex, septum, stria medullaris of thalamus, midbrain and pons. Vacuolar lesions in the major part of thalamus lacked deposition of C3 (Fig. 6). In 22L-infected mouse brains at 90 dpi, mild vacuolar lesions and PrP^{Sc} were distributed similar to those in Chandler-infected mice. However, in contrast to the Chandler-infected mice, the dorsal part of thalamus lacked C1q immunoreactivity, despite the presence of vacuolar lesions and PrP^{Sc} (Fig. 6). Moreover, C3 staining was much more pronounced in the thalamus (Fig. 6) and also was distributed widely throughout other regions including the hypothalamus, stria terminalis, septum, cerebral cortex, midbrain, pons, medulla oblongata and medulla of the cerebellum (Fig. 5). These results suggested that there were differences in complement activation between Chandler- and 22L-infected mouse brains at 90 dpi. At 133 and 166 dpi, C1q and C3 signals were widely distributed both in Chandler- and 22L-infected mouse brains and there was no substantial difference between the two scrapie strains (data not shown). Neither C1q nor C3 signal was detected in mock-infected mouse brains at any time points (Fig. 6).

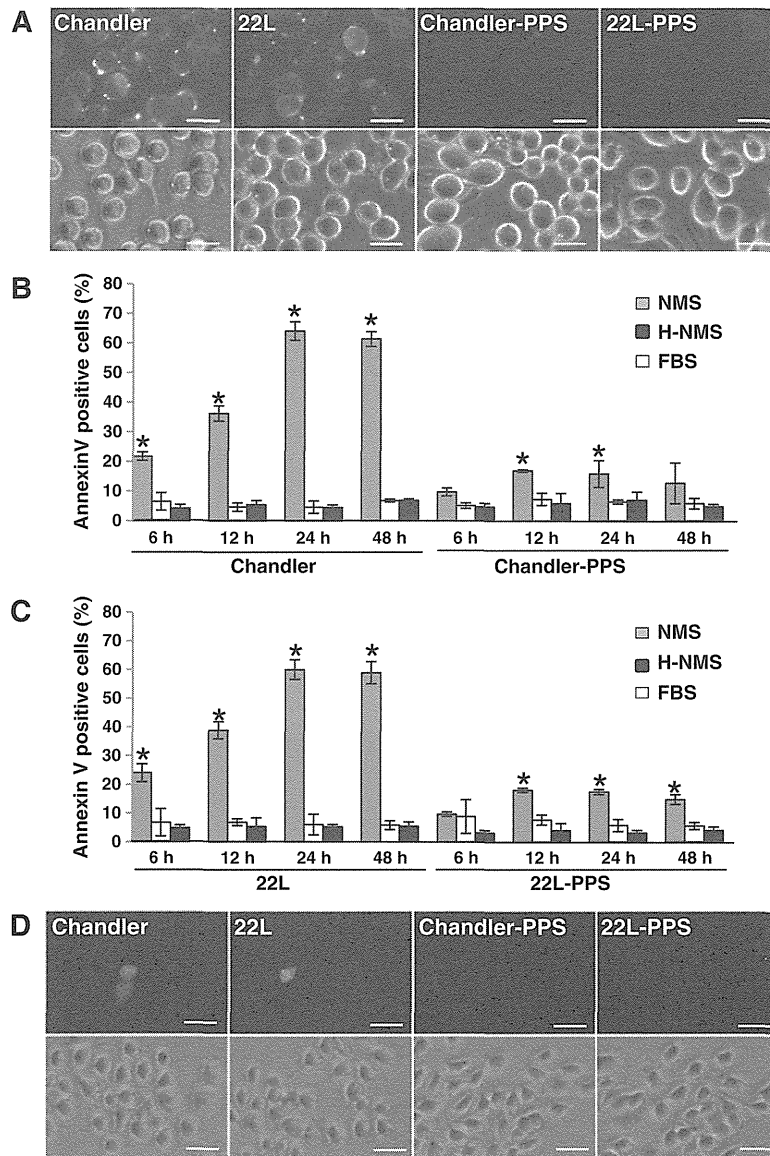


Fig. 1. Effects of treatment of scrapie-infected N2a cells with NMS. (A) Annexin V staining on N2a cells treated with NMS. Chandler-infected, 22L-infected or PPS-cured (from Chandler or 22L infection, respectively) N2a cells were seeded in 24 well plates and cultured for 2 days. The cells were treated with 10% NMS for 24 h and stained with Annexin V. Bars show 20 μ m. (B) Time course of the percentage of Annexin V positive cells in Chandler-infected and PPS-cured N2a cells. The cells were treated with NMS, H-NMS or FBS for 6, 12, 24 and 48 h and stained with Annexin V. The graphs show the means of the proportion of Annexin V positive cells in three fields. The error bars show standard deviation (SD). Gray bars, NMS treated cells. White bars, HS treated cells. Black bars, FBS treated cells. * $p < 0.01$ vs H-NMS or FBS-treated cells (Student's t test). The results are representative of 3 independent experiments. (C) Time course of the percentage of Annexin V positive cells in 22L-infected and PPS-cured N2a cells. The graphs show the mean of the proportion of Annexin V positive cells in three fields. The error bars show SD. Gray bars, NMS treated cells. White bars, H-NMS treated cells. Black bars, FBS treated cells. * $p < 0.01$ vs HS or FBS-treated cells (Student's t test). The results are representative of 3 independent experiments. (D) PI uptake into N2a cells treated with NMS. Chandler-infected, 22L-infected or PPS-cured (from Chandler or 22L infection, respectively) N2a cells were seeded in 24 well plates and cultured for 2 days. The cells were treated with 10% NMS for 24 h and stained with PI. Bars show 50 μ m.

Discussion

Our current data suggest that the reaction of complement factors differs between Chandler and 22L scrapie strains. There are multiple distinct prion strains distinguished by biological and biochemical typing, even though the amino acid sequence of the constituent protein is identical. Strains can differ in incubation period, neuropathology, cellular tropism, the size of protease-resistant PrP^{Sc} fragments, PrP^{Sc} glycosylation ratios, and PrP^{Sc} conformation (Bessen and Marsh, 1992; 1994; Bruce et al., 1989; Caughey et al., 1998; Kuczius and

Groschup, 1999; Mahal et al., 2007; Safar et al., 1998). In this study, we used two mouse-adapted scrapie strains, Chandler and 22L. These two strains can be distinguished by biochemical typing, such as PrP^{Sc} glycoform profiles, replication efficiency in cell culture, and conformation (Atarashi et al., 2006; Baron et al., 2011; Mahal et al., 2007; Nishida et al., 2000; Sim and Caughey, 2009). In contrast, biological properties of these strains, such as incubation period, distribution of pathological lesions and deposition of PrP^{Sc}, are similar, although the vacuolar lesions in the cerebellum are more prominent in Chandler-infected mice (data not shown). Our study provides

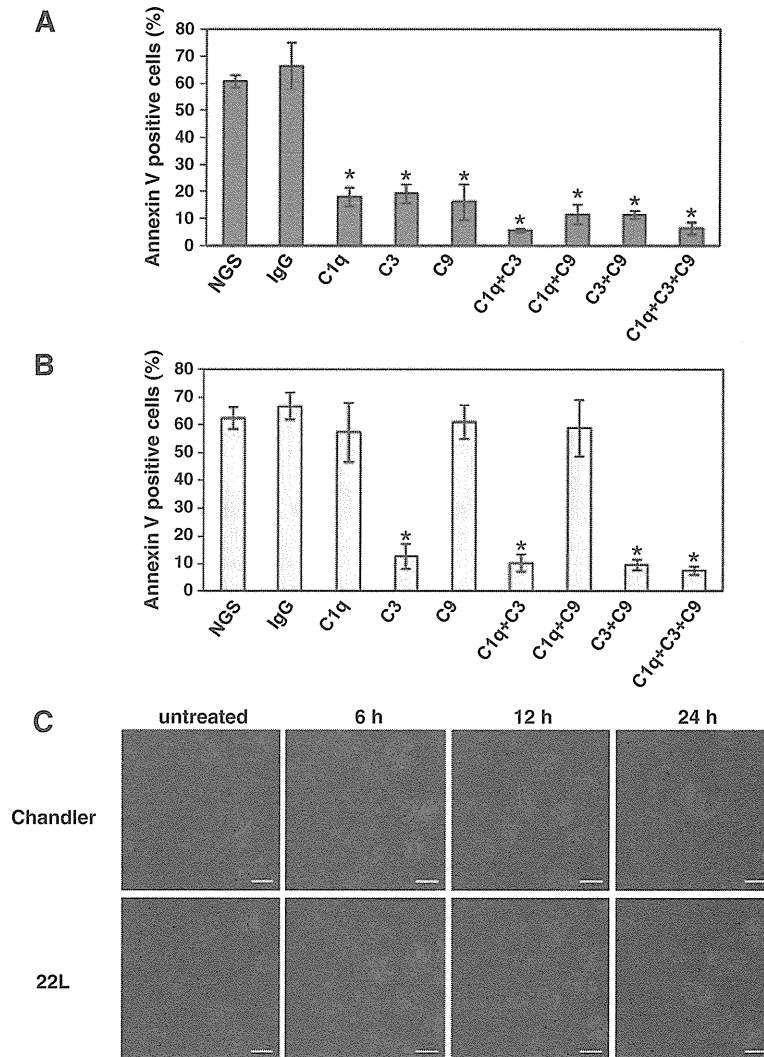


Fig. 2. Effects of pre-incubation of NMS with anti-complement antibodies on the number of Annexin V positive cells in Chandler- (A) and 22L-infected N2a cells (B). NMS were incubated with anti-C1q, C3 and/or C9 goat serum for 3 h at 4 °C. Then Chandler- or 22L-infected cells were treated with the NMS. For the control, NMS were treated with normal goat serum (NGS) or anti-mouse IgG goat serum (IgG). The graphs show the means of the proportions of Annexin V positive cells in three fields. The error bars show SD. * $p < 0.01$ vs NGS or IgG-treated NMS (Student's *t* test). The results are representative of 3 independent experiments. (C) MAC formation on Chandler- and 22L-infected N2a cells after NMS treatment. The cells were treated with NMS for 6, 12 and 24 h, fixed and subjected to immunocytochemistry for MAC. Red, MAC. Blue, DAPI. Bars show 10 μ m.

evidence that differential reactivity with complement factors is a biological feature that discriminates the Chandler and 22L strains. Accordingly, it will also be of interest to compare the involvement of complement factors in infections with other mouse-adapted scrapie strains, such as Obihiro, G1 and ME7 that have distinct biological properties (i.e., incubation period, distribution of pathological lesions, glial activation).

The reason for the difference in complement factor reactivity between the Chandler and 22L strains remains unclear. Our confocal microscopy data indicate that PrP was colocalized with C1q in Chandler-infected N2a cells, whereas PrP in 22L-infected N2a cells was colocalized with C3. The resolution of confocal microscopy does not allow us to conclude unequivocally that complement factors bind directly to PrP or PrP^{Sc}. However, one of the possible explanations for different complement reactivities of Chandler and 22L PrP^{Sc} is that they directly bind to C1q and C3 with different relative affinities. Another possibility is that these strains have different affinities for inhibitors of C5 convertase and

MAC formation, such as C4b binding protein, clusterin, CD59 and fibronectin (Speth et al., 2008), resulting in differences in MAC formation on Chandler and 22L-infected N2a cells. Recombinant PrP, fibrils, oligomers and purified PrP^{Sc} directly bind C1q in vitro and induce complement activation (Blanquet-Grossard et al., 2005; Dumestre-Perard et al., 2007; Mitchell et al., 2007; Sim et al., 2007; Sjoberg et al., 2008). Moreover Veerhuis et al. (2005) reported that C1q enhanced PrP-peptide fibril formation. C4b binding protein also binds recombinant PrP in vitro (Sjoberg et al., 2008). However, further study is needed to demonstrate whether pathogenic forms of PrP bind complement factors and/or their inhibitors in prion infections in vivo and in cultured cells.

We didn't detect colocalization of C3 and PrP in Chandler-infected N2a cells, which seems to be conflicting with respect to involvement of C3 for the Chandler strain in translocation of phosphatidylserine in N2a cells. We suggest two possibilities for the reason. One is that C3 may be involved in the process of MAC formation through classical and/or lectin pathways without directly binding to PrP/PrP^{Sc}. Another