

Neuroscience. 31(9)1093-1095, 2013

2. 学会発表

- 1) Doh-ura K. Drug discovery for prion diseases: dream and reality. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Nagasaki, July21-22, 2013
- 2) Sakai E, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Glycerol enhances the PrPres production via a PI3K signaling pathway in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Nagasaki, July21-22, 2013
- 3) Kurahashi H, Oishi K, Arai C, Ishiwata M, Chan-Gi Paek, Sako Y, Doh-ura K., Nakamura Y. Mechanisms of anti-prion factors in yeast. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Nagasaki, July21-22, 2013
- 4) 逆瀬川裕二、西澤桂子、堂浦克美. プリオン複製に関わる宿主因子の細胞生物学的および生化学的な探索アプローチ. 第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11日-13日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

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)

研究協力者 佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所・所長)

研究要旨

国内で確認された cBSE および L-BSE 由来プリオンを脳内接種されたカニクイサルの病理学的検索を行った。変異型 CJD (vCJD) の原因とされる C-BSE プリオンを接種されたサル脳組織では、報告されている vCJD 症例の病理組織像と極めて類似していた。特徴的なプラーク型のプリオンの沈着パターンはサル脳内接種継代 3 代目においても保存されていた。一方、L-BSE に由来するプリオン接種サルの脳では、プラーク型のプリオン沈着像は認められず、シナプスタイプのプリオン沈着像を示した。

A. 研究目的

本研究では、BSE 由来プリオンのヒトへの病原性並びに病態の把握を目的として、国内発生 BSE 由来プリオンのサルへの感染実験を行い、病理学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

サルへの感染実験では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。

B. 研究方法

1) 定型 BSE (C-BSE) プリオン脳内接種サルの病理学的解析

本邦で確認された定型 BSE である wakayama 株を脳内接種されたサルの病理学的解析を行った。サル脳内での継代 3 代目となるサルを安楽殺後、右半球をホルマリン固定し検索検体とした。各部位を切り出し後、ギ酸固定を行いパラフィンブロックを作成した。HE 染色並びに抗プリオン抗体 T4 を用いて免疫染色を行った。比較検討として、BSE 罹患牛 (Wakayama) 脳乳剤接種サル、脳内継代 2 代目サル標本を用いた。

C. 研究結果

1) 定型 BSE (C-BSE) プリオン脳内接種サルの病理学的解析 (図 1, 2)

脳内接種継代 3 代目サルの脳組織では、大脳皮質や小脳分子層でプラーク型のプリオン沈着像を認めた。同時にシナプスタイプの沈着パターンも散見された。大脳皮質、小脳髄質では空胞変性が顕著に観察された。プラーク型のプリオン沈着パターンは初代接種サルから 3 代目まで保存されていた。

2) 非定型 BSE (L-BSE) プリオン脳内接種サルの病理学的解析

本邦で確認された非定型 BSE である Sasebo 株を脳内接種されたサルの病理学的解析を行った。安楽殺後のサル脳右半球を上記 1) と同様に処理し、病理学的解析を行った。

2) 非定型 BSE (L-BSE) プリオン脳内接種サルの病理学的解析 (図 4, 5)

プリオンの沈着パターンは中枢神経組織全域にわたりシナプスパターンを示した。空胞変性も高度に観察された。

D. 考察

1) 定型 BSE (C-BSE) プリオン脳内接種サル の 病 理 学 的 解 析

BSE 由来プリオンに起因するヒト変異型 CJD (vCJD) の病理組織像の特徴はプラーク型のプリオン沈着パターンを示すことが報告されている (図 3)。 カニクイサルへの感染実験においてもヒトで認められるプラーク型のプリオン沈着パターンを示した。このことから、カニクイサルを用いたプリオン感染実験系は、vCJD のモデルとして有用であることが示唆された。継代 2 代及び 3 代目のサルにおいてもプラーク型のプリオン沈着パターンを呈した。同時に継代 2 代目、3 代目ではプリオン病発症期間および病態進行の短縮が認められている。組織学的にはシナプスパターンのプリオン沈着と空胞変性も顕著に認められている。ヒト孤発性プリオン病である sCJD においてもシナプスパターンのプリオン沈着を示す例では、急激な病態進行を示すことが知られている。本研究では、cBSE プリオンのサルでの継代に伴う潜伏期・病態進行スピードの短縮といった臨床的な特徴と病理学的特徴の一致を認めた。近年の報告では、潜在的なプリオン感染者数は従来の推定よりも多く、今後輸血を介した vCJD の水平感染増加の可能性が示唆されている。加えて、これまでの vCJD 患者のプリオン蛋白質遺伝子多型では 129M/M であったが、潜在的なプリオン感染者には他の多型も含まれており、水平感染後の vCJD 患者の病理組織像は多彩になる可能性が考えられる。本研究で得られた C-BSE のサルでの継代実験から得られる病理組織像の変化はヒトでの vCJD 水平感染例の病理組織像を推定するうえで貴重な資料となると考えられる。

2) 非定型 BSE (L-BSE) プリオン脳内接種サル の 病 理 学 的 解 析

L-BSE 由来プリオン脳内接種サルでは C-BSE で誘導されるプラーク型のプリオン沈着パターンは認められなかった。空胞変性は非常に高度であり、急激な病態進行といった臨床所見と合致する所見であった。この所見はヒトの孤発性 CJD のシナプスタイプの組織病理像と極めて類似していた (図 6)。L-BSE のヒトへの経口での感染性は明らかではないが、ヒトへ侵入した場合、既存の

CJD との鑑別が非常に難しいものとなる可能性が示唆される。

E. 結 論

各種 BSE 由来プリオンのヒトへの病原性・病態を知る上で動物モデルは必須である。本邦で確認された C-BSE に分類される Wakayama 株のサルへの接種実験では、報告された vCJD と同様の病理組織像を示しており、動物モデルとして極めて有用であることが示された。近年、vCJD の輸血等を介した水平感染の発生が懸念されており、本研究で行っているサルを用いた C-BSE プリオンの継代は、水平感染 vCJD の病理組織像の推移を推定する重要な知見となる。また、L-BSE のヒトへの感染の報告はなされていないが、霊長類が感受性を有することが本研究でも明らかとなった。今後、経口での感受性等について検討がなされるべきと考える。

F. 健康危険情報

報告事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1.. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Jul 24 published online

2. 学会発表

1) 該当なし

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

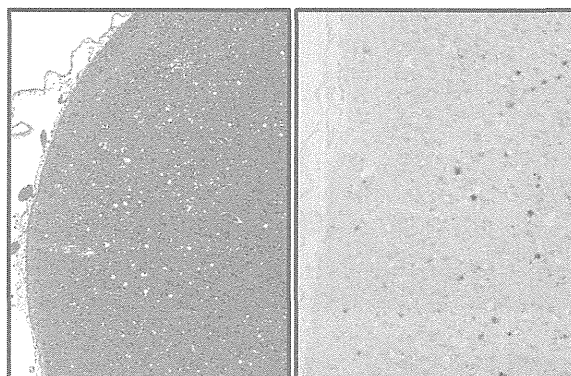


図 1 . C-BSE(Wakayama) 継代 3 代目サル側頭葉
皮質でのプラーク型を呈するプリオン沈着と空胞変性を認める。

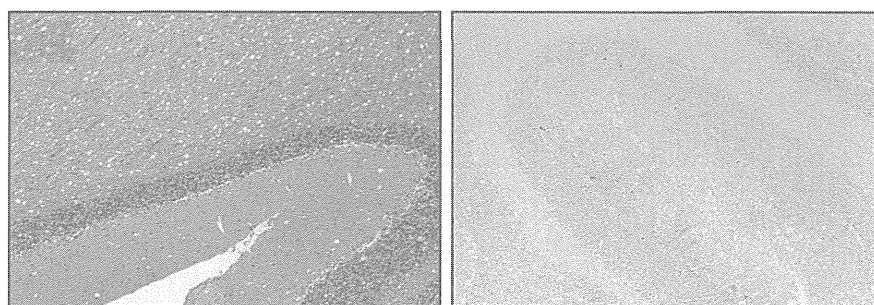


図 2 . C-BSE(Wakayama) 継代 3 代目サル小脳
分子層でのプラーク状のプリオン沈着パターンと髄質の空胞変性を認める。

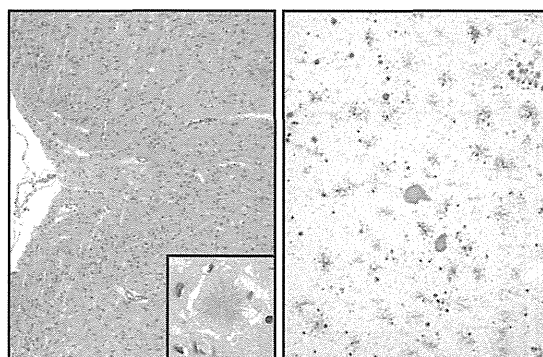


図 3 . ヒト vCJD 症例。プラーク型のプリオン沈着パターンを示す。

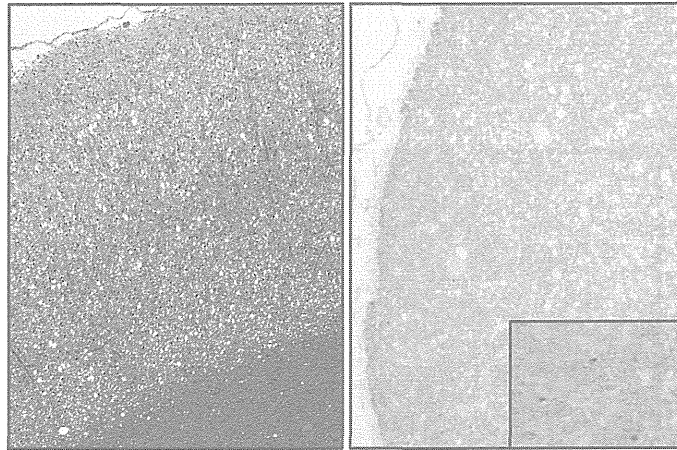


図 4. L-BSE(Sasebo) 脳内接種サル大脳
空胞変性が顕著で、プラーク状のプリオン沈着は認められず、シナプスタイプを呈する。

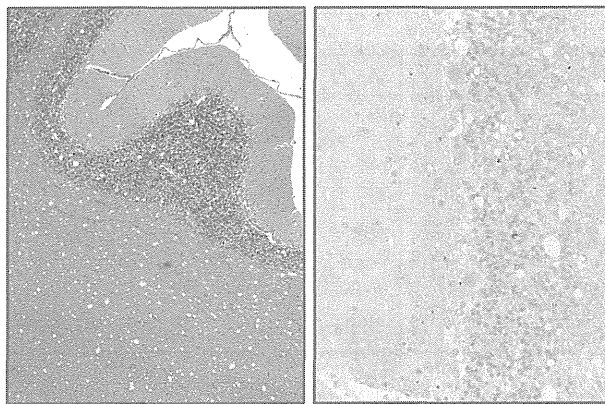


図 5. L-BSE(Sasebo) 脳内接種サル小脳
髄質の空胞変性が顕著で、シナプスタイプのプリオン沈着を認める。

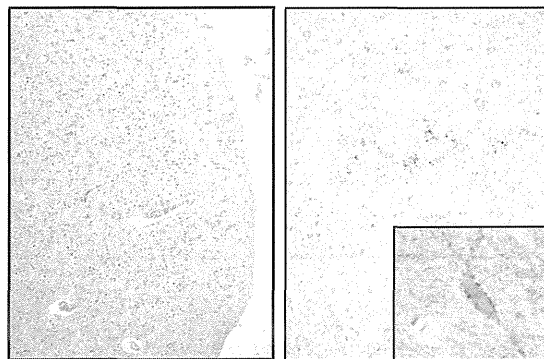


図 6. ヒト孤発性 CJD (sCJD) 症例。空胞変性、シナプスタイプのプリオン沈着像を示す。

8. 定型および非定型BSE プリオンの蛋白質化学的な比較解析

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 本研究では、定型および非定型 BSE プリオンの性状比較を目的として、次の2点に関する研究を進めた。1) 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・プリオン蛋白質の場合、Asn¹⁹²と Asn²⁰⁸)の糖鎖付加優位性について調べる。2) L-BSE プリオンは近交系マウスへの直接伝播が困難であることがこれまでに示されてきたが、一旦カニクイサルへ伝播させた後で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?)という新たな疑問点について答える。研究の結果、1)については昨年度に続いて新たに開発した分析法を進め、C-BSE プリオンでも L-BSE プリオンでも、その一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖は Asn²⁰⁸ への付加優位性があると解釈される実験データを得た。しかし、このデータを補足すべく本年度末に別の生化学実験を行ったところ、これまでに得たデータの解釈と必ずしも整合しない点があることが判明し、上述を結論とするには尚早であり、今後の慎重な解析が更に必要であると考えられるようになった。2)については、カニクイザルへ伝播後の L-BSE プリオンを脳内接種した C57BL/6J マウスの経過観察を初年度の実験開始から2年以上追跡してきた。その結果、サルへ伝播後の L-BSE プリオンは、マウスの自然寿命の内に発症症状を呈しなかった。また、サル伝播 L-BSE プリオンを接種した PrP^{Sc} の脳内蓄積は、ウエスタンブロット分析では検出限界以下だった。すなわち、L-BSE プリオンは霊長類モデルへの感染を経ても変異型 CJD プリオン様へ転換することはない、という重要な知見が得られた。

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 [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)が、近交系マウスなどに対して古典的 BSE プリオン(C-BSE プリオン)とは異なる病原性をもつことが明らかになっている[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、Prion 2: 123, 2008、など]。L-BSE プリオンは、C-BSE プリオンとは異なり、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動/ウエスタンブロット分析で検出される一糖鎖型 PrP^{Sc} の存在比が高いという特徴を有する。このような一糖鎖型の高い存在比が L-BSE プリオンの PrP^{Sc} 凝集体構造 一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。しかし一糖鎖型 PrP^{Sc} において、糖鎖付加候補部位で

ある2つの Asn 残基のどちらか一方に糖鎖付加の優位性があるか否かという点は解明されていない。本研究では、この優位性の詳細を調べることを目的とする。さらに、C-BSE プリオンと L-BSE プリオンはカニクイサルへ伝播可能であるが、伝播後の両プリオンのウエスタンブロット分析では PrP^{Sc} の糖鎖型による電気泳動パターンが相互に近似化し、その差異が曖昧となる。このことからカニクイザル(霊長類モデル)への伝播により、L-BSE プリオンの病原性等が C-BSE プリオン様に転換する可能性が想定された。そこで、近交系マウスへの病原性を指標として、この点を検証することを目的とする。以上により、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) 糖鎖付加の優位性の解析

PrP^{Sc} を含む試料の溶解性などが障害となり、液体クロマトグラフィー/質量分析の手法は不相当である

ことが過去の経験からわかっていた。そこで、ウェスタンブロット法を短鎖ペプチドに適用した新たな方法を開発し、この方法による分析を進めた(原理は 23 年度報告書、具体的な手順は 24 年度報告書に記載)。

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

2011 年 12 月に L-BSE プリオン(BSE/JP24 由来)を一次伝播させたカニクイザル(#15)の脳(視床部)ホモジネートを C57BL/6J マウス(8 週齢、♀)へ脳内接種し、2014 年 1 月まで経過を追跡・観察した。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)を同系マウス(8 週齢、♀)へ脳内接種した。プリオン接種後のマウスは健康状態に応じて人道的エンドポイントを設定し、飼育期間が最長 750 日に達した時点で実験を終了させた。採材した脳、脾、回腸遠位部は、ウェスタンブロット法および組織染色/免疫組織化学染色法により PrP^{Sc} の増殖・蓄積を検索した。

(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) 糖鎖付加の優位性の解析

全年度までに、新規に考案した分析系を用いて 2 つの Asn 残基の糖鎖付加比が算出できることを確認した。そこで、この方法を L-BSE プリオンと C-BSE プリオンの一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖付加部位に優位性があるか否か、という問題の解析に適用してきた。

本年度も、幾つかの方法上の改良を加えつつ本法による解析を続けた。その結果、得られた実験データをシミュレーション値と比較することで、C-BSE プリオンでも L-BSE プリオンでも、その一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖は C 末端寄りの Asn²⁰⁸ への付加優位性があると解釈するに至った。

但し、この方法は Asn¹⁹² の糖鎖付加の有無は直

接測定できるが、Asn²⁰⁸ の糖鎖付加については間接的(=差し引きにより推定)に求めなければならないという弱点がある。そこで、市販の抗プリオン蛋白質抗体(POM 抗体、Prionatis AG 社)を使った実験を本年度後期になって着想し、上記データの補足・補強実験を行った。その結果、対照試料としてマウスへ馴化させたスクレーピー Obihiro I 株を感染させた C57BL/6J マウス脳を分析にかけたところ、脳に蓄積した一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖付加には、C 末端寄りの Asn 残基への付加優位性が示唆され、この結果は上記の新規分析法で得られた結果と整合した。ウシ C-BSE プリオンについても、おそらく C 末端寄りの Asn²⁰⁸ への付加優位性があると示唆される結果となった。ところが、意外なことに、ウシ L-BSE プリオンについては、上述の新規分析法の結果に調和するとは解釈し難い結果となった。

2) カニクイザルへ伝播後の L-BSE プリオンの近交系マウスへ伝播実験

マウスへの接種ホモジネートのドナーとなったカニクイザル(C-BSE=#7、L-BSE=#15、健常コントロール=#8)のプリオン蛋白質については、Met/Met¹²⁹ および Glu/Glu²¹⁹ のホモ接合体であることは研究当初に確認していたが、ORF 全長の塩基配列情報は未確認であった。本年度は、カニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子 ORF 全長を増幅する PCR 条件を設定し、この PCR 条件を用いて接種ホモジネートのドナーとなるカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子 ORF 全長の DNA シークエンシングを行った。その結果、ドナー・サルのプリオン蛋白質にはアミノ酸の変異を伴う遺伝子変異が無いことを確認した。また、前年度に引き続き、L-BSE プリオン感染サル(#15)脳ホモジネートを接種したマウスおよび健常サル(#8)脳ホモジネートを接種したマウスの観察を最長飼育期間 750 日まで(個体の状態に応じて人道的エンドポイントを設定)追跡した。その結果、いずれのマウスにおいてもプリオン病に起因すると思われる神経症状は認められず、ウェスタンブロット分析ならびに免疫組織化学分析による脳、脾、回腸での PrP^{Sc} の増殖・蓄積も検出されなかった。

D. 考察

1) 新規に開発した分析法により一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖付加部位の優先性について調べた。その結果、一糖鎖型 PrP^{Sc} ではC末端側の Asn 残基(ウシ・プリオン蛋白質の場合、Asn²⁰⁸)への糖鎖付加の優先性があると解釈されるデータが得られた。しかし、この解釈を補足・補強すべく本研究期間の最終期に別の手法による追加実験を着想し、その実験を行ったところ、マウスへ馴化させたスクレーピーObihiro I 株プリオン、ウシ C-BSE プリオンについては新規分析法で得られた結果と整合する結果が得られた。一方、ウシ L-BSE プリオンについては、上述の新規分析法の結果に調和すると考えるには疑義がある結果となった(データ未発表)。この齟齬が何に起因するのかを明らかにするとともに、特にウシ L-BSE プリオンの一糖鎖型 PrP^{Sc} の糖鎖付加部位の優先性については、上述の実験結果・解釈を以て結論とするのは尚早であり、今後の慎重な解析が必要と考えられる。

2) vCJD プリオンが近交系マウスへ潜伏期間 370 日程度で伝播可能であるのに対し、孤発性 CJD プリオンは近交系マウスへ伝播し難いこと知られている[Nature 389: 448, 1997、ほか]。本実験において C-BSE 感染サル(#7)の脳ホモジネートを接種したマウスは、前年度までに全匹が神経症状を示し、人道的エンドポイント点で安楽殺に処した(プリオン接種から発症末期までの日数の中間値=375 日、最短 345 日、最長 405 日)(図1, 2)。一方、本年度に経過観察を継続追跡した L-BSE 感染サル(#15)の脳ホモジネートを接種したマウスはマウスの自然寿命近くまでプリオン病の発症に至らず、伝播は困難であることがわかった(図3)。本研究以前に実施した研究において L-BSE 罹患ウシの脳ホモジネートを直接接種したマウスでも、L-BSE プリオンの近交系マウスへの伝播は困難であった[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)」]が、今回の研究結果は、L-BSE プリオンはサルへの実験的伝播を経ても当初の自然発症ウシ(BSE/JP24)の感染性の特徴が(マウスへの伝播を指標として判断すると)変化しないことがわかった。本研究の発案当初は、L-BSE プリオンを一旦サルへ伝播させると病原体側または宿主側の要因によって vCJD プリオン様に転換するのではないか、という可

能性を考えていたが、この可能性は否定された。この実験結果は、L-BSE プリオンのヒトへのリスク評価という観点のみならず、L-BSE プリオンと C-BSE プリオンの起源を考察する上でも興味深く、また、既報の研究[PLoS Pathog 3: e31. doi:10.1371/journal.ppat.0030031, 2007]の解釈とは必ずしも合致しない結果である点は注目すべき結果であると思われる(投稿準備中)。また、これまでに L-BSE プリオンとヒト孤発性 CJD プリオンとの関連性の有無が指摘されている[Proc Natl Acad Sci USA 101: 3065, 2004, Emerg Infect Dis 18: 2028, 2012]が、CJD プリオンは概して近交系マウスへの伝播が困難であることが知られており、本実験結果と考え合わせると示唆深い。

E. 結論

一糖鎖型 PrP^{Sc} における糖鎖付加の優先性について調べた。研究期間中の主要実験からは、C-BSE プリオン/L-BSE プリオンの PrP^{Sc} とともに Asn²⁰⁸ への優先性があると解釈されるデータを得た。しかし、L-BSE プリオンについてはその後の補足実験の結果が、この解釈に必ずしも合致しないことが判り、上記の解釈は更に慎重に検討する必要がある。

また、カニクイザルへ伝播後の C-BSE プリオンならびに L-BSE プリオンの近交系マウスへの伝播実験を実施した。マウスへの感受性を指標として判断すると、霊長類モデルへの感染を経ることにより L-BSE プリオンが vCJD プリオン様へ転換することはない、という重要な知見が得られた。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuura, Y., Ishikawa, Y., Somerville, R.A., Yokoyama, T., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Sata, T., Kitamoto, T., and Mohri, S. A rapid bioassay for classical and L-type bovine spongiform encephalopathies. Open J. Vet. Med., 3: doi 10.4236/ojvm.2013.31013, 2013

- 2. 学会発表
無し

- 1. 特許取得
無し
- 2. 実用新案登録
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

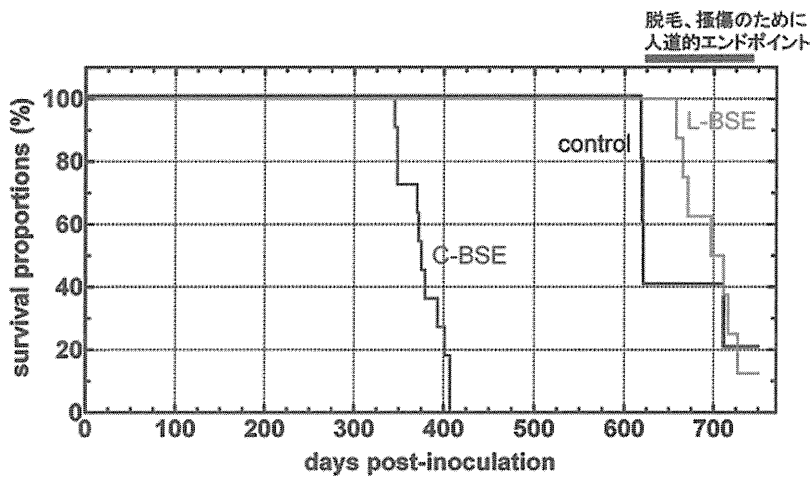


図 1

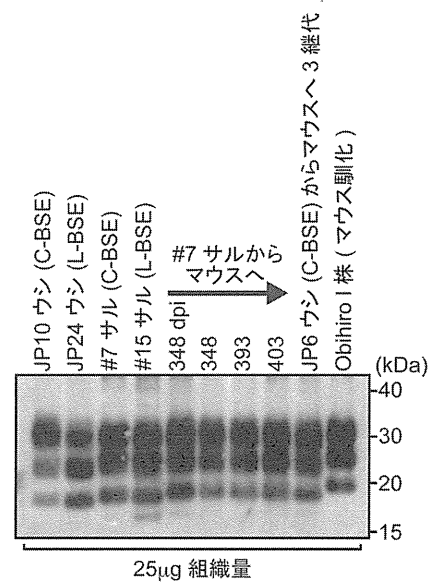


図 2

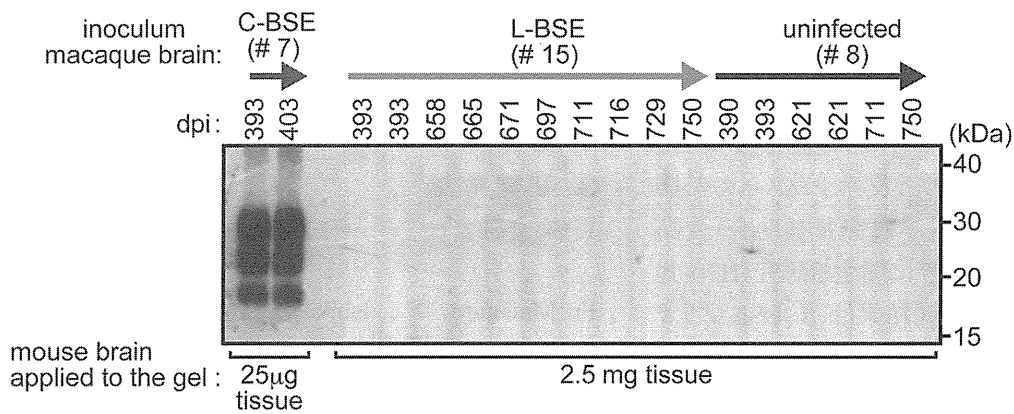


図 3

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)

藤井 貴志 (道総研 畜産試験場 基盤研究部 畜産工学G)

岡田 洋之 (農研機構 動物衛生研究所 インフルエンザ・プリオン病研究センター)

横山 隆 (農研機構 動物衛生研究所 インフルエンザ・プリオン病研究センター)

研究要旨

本研究は、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、非定型 BSE 感染牛のビデオ画像からモーションキャプチャー (動作のデジタル解析) により歩様解析するとともに非定型 BSE 感染牛の行動量解析により、非定型 BSE 感染牛の臨床症状の客観的評価に資するデータを取得する。非定型 BSE 感染牛の歩様解析では、発症後に歩行時における殿部後端と後肢球節間の距離の延長がみられた。また、非定型 BSE 感染牛の行動量解析では、発症後に休息状態の減少が継続することを明らかにした。以上のことから、歩様および行動量の解析は、非定型 BSE 感染牛の臨床症状を客観的に把握できることが示唆された。

A. 研究目的

飼料規制などの管理措置により定型 BSE の発生は減少している。しかし、定型 BSE と性状の異なる非定型 BSE が欧米諸国で多数報告され、国内でも 2 例の BSE 患者が非定型 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。

本年度は、非定型 BSE 感染牛のビデオ画像か

らモーションキャプチャー (動作のデジタル解析) により歩様解析するとともに非定型 BSE 感染牛の行動量解析により、非定型 BSE 感染牛の臨床症状の客観的評価に資するデータを取得する。

B. 研究方法

1) 脳内接種により作出した非定型 BSE 感染牛 2 頭 (5184、6802)、定型 BSE 感染牛 1 頭 (6697) および BSE 陰性脳乳剤を接種した対照牛 3 頭 (5795、5825、9050) を用いた。非定型 BSE 感染牛は接種後 11、13、14 および 15 ヶ月、定型 BSE は接種後 12、13、14、18、19 および 20 ヶ月に歩様解析を実施した。供試牛の前肢の前膝および球節、後肢の飛節および球節にマーカーを取り付けた。長さ 4m、幅 95cm の通路を歩行させ、120 コマ/秒で側方からデジタルビデオカメラ (CASIO、EX-ZR300) を用いて撮影した。各マーカーの移動距離の計測は、撮影した動画データをパソコンに取り込み、二次元動画解析ソフト (Move-tr/2D、ライブラリー社) を用いた。

2) 試験1に用いた非定型 BSE 感染牛 2 頭、定型 BSE 感染牛 1 頭および対照牛 3 頭、さらに 2009 年 5 月～2010 年 9 月に実施した非定型 BSE 感染牛 1 頭 (7434) および対照牛 1 頭 (7335) の行動量測定データを用いた。牛用歩数計 (TMT441E、コムテック) を右前脚に装着し、1 時間毎の歩数を測定し、得られた測定値 (10 歩単位で 1 桁の値は切り捨て) を 1 時間の行動量とした。行動量の測定値から 1 日の休息行動時間を評価するために、「1 日のうち、連続する 2 時間の行動量が 20 以下であった回数」を休息スコアと定義した。また連続する 7 日間の休息スコアの合計を週間休息スコアとした。

(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) 5184、6802 の殿部後端と後肢球節間の距離は、臨床症状のみられない接種後 11 ヶ月で、それぞれ 11.8 および 16 cm であった。一方、臨床症状の発現した接種後 13、14、15 ヶ月では、それぞれ 23.8、18.2、19.9 および 18.2、17.2、14.2 cm であり、特に 5184 では接種後 11 ヶ月と比較し大きい値を示した。

2) 非定型 BSE 感染牛の休息スコアは、症状確認前は、対照牛 (BSE 陰性) と同様に経過していたが、症状確認後では、明らかに減少した。非定型 BSE 感染牛の週間休息スコアは解剖 2 ヶ月前に 10 未満となる週が継続した。対照牛では、観察期間において週間休息スコアが 10 未満になることは無かった。非定型 BSE 感染牛 3 頭の解剖直前の週間休息スコア 5.0 ± 2.6 であった。対照牛 4 頭の週間休息スコアは 28.0 ± 6.1 であり、非定型 BSE 感染牛の週間休息スコアは、対照牛に比較しそれぞれ明らかな差が認められた。

D. 考察

モーションキャプチャーによる歩様解析により、判定の難しい BSE 感染牛の歩様の変化を数値化し、客観的に変化を把握することが可能であった。非定型 BSE 感染牛では、臨床症状の発現がみられた接種後 13 ヶ月以降で殿部後端と後肢球節間の距離が対照群や臨床症状の見られない時期の定型 BSE 感染牛と比較し大きくなっていったことから、殿部後端と後肢球節間の距離が歩様の変化の客観的評価指標になる可能性が示された。

本試験で行った行動量測定で、新たに定義した「休息スコア」により、非定型 BSE 感染牛の行動量の変化を表すことができ、臨床症状を客観的に評価するための指標となり得ることが示唆された。特に休息スコアの継続的な低値を評価する週間休息スコアが 10 を下回ることは、対照牛では見られず、BSE の発症牛に限らず中枢神経の疾患により行動量の変化を示す牛を発見できる可能性が示された。

E. 結論

非定型 BSE 感染牛の歩様解析では、歩行時における殿部後端と後肢球節間の距離の延長がみられた。また、非定型 BSE 感染牛の行動量解析により、発症時に休息状態の減少が継続することを明らかにした。以上のことから、歩様および行動量の解析により、非定型 BSE 感染牛の臨床症状を客観的に把握できることが示唆された。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okada, H., Miyazawa, K., Fukuda, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Fujii, T., Fujii, K., Kageyama, S., Yoshioka, M., Murayama, Y. and Yokoyama, T. The Presence of Disease-Associated Prion Protein in Skeletal Muscle of Cattle Infected with Classical Bovine Spongiform Encephalopathy. J Vet Med Sci. (in press)

2. 学会発表

1) Fukuda S, Fujii T, Kageyama S, Okada H,

Yokoyama T, Murayama Y, Detection specificity of salivary BSE PrP^{Sc} by PMCA. APPS2013. Sasebo, July 21-22, 2013

- 2) 福田茂夫、藤井貴志、陰山聡一、岡田洋之、横山隆、村山裕一 PMCA法を用いたBSE発症牛の唾液からのPrP^{Sc}検出技術 日本産業動物

獣医学会（北海道）帯広市、9月5-6日

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 感染牛の臨床症状の出現

牛 No.	接種脳乳剤	症状確認 月数*	主な症状	解剖月数*	脳幹部 PrP ^{Sc}
					WB
5184	非定型 BSE	13	異常歩様	15	+
6802	非定型 BSE	13	異常歩様	15	+
6697	定型 BSE	18	異常歩様、神経質	21	+
5795	BSE 陰性	—	なし	27	—
5825	BSE 陰性	—	なし	26	—
9050	BSE 陰性	—	なし	26	—

※症状確認月数、解剖月数：接種から解剖までの日数÷30 で算出。小数点以下切り捨て。

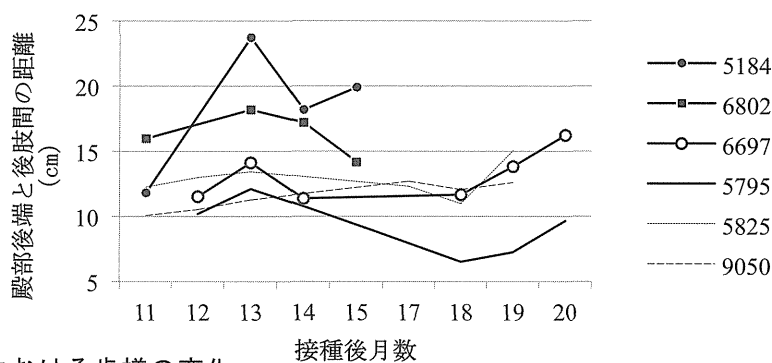
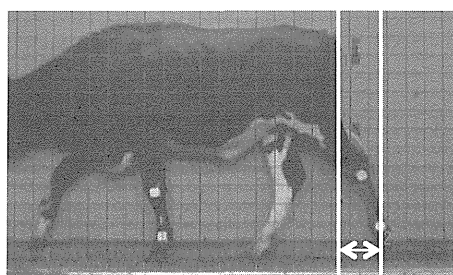


図1 BSE 感染牛の発症時期における歩様の変化
BSE 感染牛の殿部後端と後肢球節間の距離 (A: 矢印間の距離) とその変化 (B)

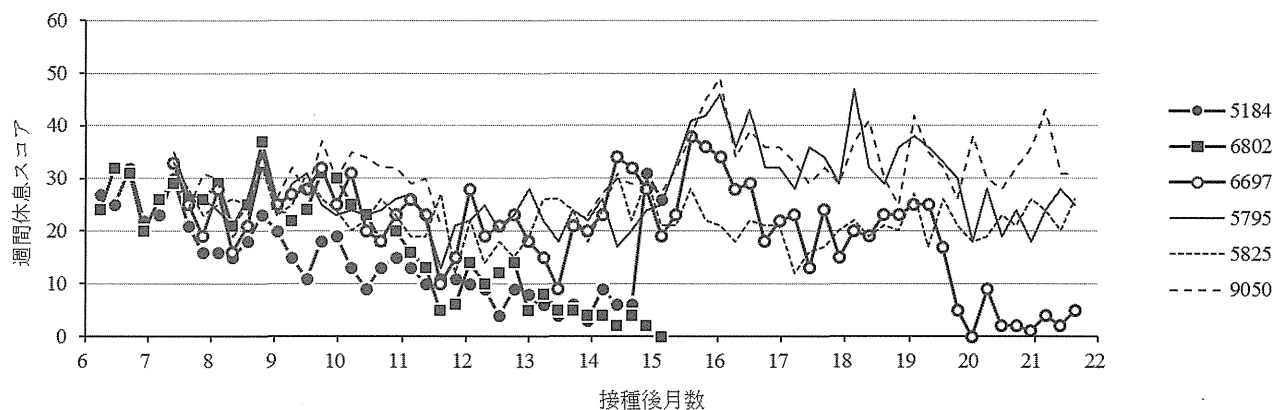


図2 BSE 感染牛の発症時期における行動量の変化

「1日のうち、連続する2時間の行動量が20以下であった回数」を休息スコアと定義した。また連続する7日間の休息スコアの合計を週間休息スコアとした。

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 帯広畜産大学基礎獣医学研究部門 助教 室井喜景

研究協力者

研究要旨 BSE 脳内接種 (IC) モルモット小脳では、ヒトのプリオン病であるクールーや sCJD-VV2 にみられる、小脳顆粒細胞の脱落と分子層幅の減少による小脳皮質の萎縮がみられる。しかしながら、動物プリオン病での本来の感染ルートである末梢からの感染においても同様の病変がみられるかは明らかでない。この感染ルートの違いによる病変の比較検討はプリオンの生物学的性状を考察する上で重要と考えられた。そこで、IC 個体の PrP^{res} 脳内分布の経時変化、IC および腹腔内接種 (IP) の病末期モルモットにおける全身の PrP^{res} 分布を免疫組織化学的に比較し、検討した。IC 群小脳では経時的検索により、PrP^{res} 沈着が顆粒層から分子層へ広がる傾向が観察され、病末期では全層に重度の沈着と、沈着に一致して皮質の萎縮がみられた。一方、IP 群では病末期においても顆粒層に PrP^{res} が限局的に沈着し、小脳のいずれの部位においても皮質の萎縮は認められなかった。IC 群小脳の経時的解析と、IC 群、IP 群小脳の病末期の病変の比較から、IP 群では小脳皮質での PrP^{res} 沈着が進行し IC 群で観察されるような小脳特徴病変を形成する前に Clinical Target Area (CTA) である脳幹部が障害され死に至ったためと考えられた。IC 群では脾臓および GALT などのリンパ系組織、消化管神経叢などの末梢神経、副腎において PrP^{res} 沈着を認めなかったのに対し、IP 群では脾臓、GALT および副腎での少量の PrP^{res} 沈着、胃から直腸全域の消化管神経叢に中等度の PrP^{res} 沈着を認めた。このことから、モルモット感染モデルにおける BSE プリオンの中枢から末梢への遠心性の伝播は否定的であり、末梢から中枢へ求心性に伝播する性状をもつと考えられた。

A. 研究目的

ヒトのプリオン病であるクールーや VV2 型孤発性 CJD において、小脳における顆粒細胞、プルキンエ細胞の脱落やバークマングリアの放射状グリオーシスがみられる。これら小脳病変は、BSE、スクレイピー、CWD などの自然発生動物プリオン病ではみられず、実験感染齧歯類などでの報告もみられない。BSE 株をモルモットに脳内接種すると、クールーや VV2 型孤発性 CJD (sCJD) における小脳病変と類似する病変が形成される。すなわち、BSE 脳内接種モルモットではプリオン沈着に一致して、小脳皮質の顕著な萎縮がみられ、その顆粒層では顆粒細胞の明らかな減少が観察される。また、小脳分子層において肥大したアストロサイトの増生が認められ、その幅が縮小する。一方、プルキンエ細胞は他 2 層と比較して、よく保存されている。しかしながら、この特徴的な病変を形成する BSE 株を、動物プリオン病の自然感染ルートである末梢を介して伝播した場合の病

態は明らかでない。

一方、BSE 株を経口投与した牛では消化管神経叢へわずかに PrP^{res} が沈着し、リンパ系組織では GALT に PrP^{res} 沈着が限局していたが、BSE 株を経口投与した羊では消化管神経叢およびリンパ系組織への広範な PrP^{res} 沈着が認められる。このようにプリオン病は宿主動物の違いによっても全身のプリオン分布が異なることが知られている。そこで今回、BSE 株脳内接種モルモットでの小脳特徴病変形成機序について考察し、この株の生物学的性状を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 動物

BSE 感染牛 (BSE/JP4) 脳から作成した 10% 脳乳剤入りリン酸緩衝液 (PBS) 50 μ l をモルモット (3~4 週齢、雌、Hartley 種; SLC、静岡) に麻酔下で脳内接種し 1 代目とした。臨床症状を示した 1 代目モルモット脳から 10% 脳乳剤入り PBS を作

成して、同様に新たなモルモットに脳内接種し、2代目とした。さらに、同様の方法で3代目脳内接種群を5匹作成した(IC群)。臨床症状を呈した時点で剖検、採材した。経時的变化を観察する為、2匹は投与230日後に計画殺した。また、BSE感染2代目モルモット脳から作成した1%脳乳剤入りPBS500 μ lをモルモット5匹に腹腔内接種し(IP群)、臨床症状を呈した時点で剖検、採材した。陰性対照として、新たなモルモット脳内に、正常モルモット脳から作成した10%脳乳剤入りPBS50 μ lを脳内接種し、投与320日後に解剖、採材した。

2) 組織学的検索

採材した部位は脳、脊髄、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、子宮、乳腺、舌、横隔膜、骨格筋(前肢、後肢、内腸腰筋、胸最長筋、腰最長筋)である。採材した組織は10%中性緩衝ホルマリンで1週間固定した後、切り出し、再固定を2日間行った。次に、98%蟻酸で1時間の処理を行いプリオンの感染性を消失させた。一昼夜水洗した後、定法に則り、脱水、パラフィン包埋を実施し、3 μ mパラフィン切片を作成し、HE染色を行った。

3) 免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索では、一次抗体として抗PrPマウスモノクローナル抗体(Clone 12F10、Cayman Chemical、U.S.A)を用いた。二次抗体として抗ウサギHRR標識抗体(DAKO Envision Kit、DAKO、U.S.A)を使用した。PrP^{res}免疫活性賦活化としてオートクレーブ法(135 $^{\circ}$ C、20分)を施し、DAB発色を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 臨床症状および肉眼所見

1代目、2代目、3代目のBSE感染IC群モルモットの臨床末期症状として、被毛粗造、後躯の運動失調、頭部震顫、歩行困難が生じ、沈鬱、削瘦がみられた。3代目IC群での病末期までの日数は293.8 \pm 15.6日(Mean \pm SD)であった。

BSE感染IP群モルモットの臨床末期症状では被毛粗造、後躯の運動失調、歩行困難の神経症状および沈鬱、削瘦が認められた。IP群での病末期までの日数は574.8 \pm 47.9日(Mean \pm SD)であった。

2) 組織学的検索

病末期に剖検したIC群の個体では、小脳回および小脳溝に顆粒細胞の明らかな脱落による顆粒層の縮小、空胞変性を伴う分子層幅の減少が認められた。間脳、中脳、橋、延髄、視床など脳幹部で重度の空胞変性を瀰漫性に認め、海馬、大脳皮質などでも空胞変性が散見された。

IP群の個体では、小脳顆粒層および分子層の萎縮は認められなかった。また、間脳、中脳、橋、延髄、視床など脳幹部に中等度から重度の空胞変性を認めたが、他部位では大脳皮質の一部に軽度の空胞変性を認めたのみだった。

3) 免疫組織化学的検索

IC群小脳は局所的に顆粒層で点状から斑状、分子層で細顆粒状に中等度から重度のPrP^{res}沈着がみられ、PrP^{res}沈着に一致して皮質の萎縮が認められた。プルキンエ細胞周囲では凝集もみられた。プルキンエ細胞は他2層と比較してよく保存されていた。IC群の海馬および海馬体ではCA1からCA3にかけての錐体細胞層、歯状回の顆粒細胞層に顆粒状に中等度から重度のPrP^{res}沈着を認めた。その他部位の脳、脳幹部においては瀰漫性に中等度から重度のPrP^{res}沈着を認めた。脊髄では灰白質に重度のPrP^{res}沈着を認めた(図1)。

IP群の個体では、小脳回および小脳溝の顆粒層に軽度から中等度のPrP^{res}沈着が点状から斑状に認められたが顆粒細胞の脱落は認められず、分子層へのPrP^{res}沈着はわずかであり3層ともよく保存されていた(図1)。IP群の海馬および海馬体では一部血管周囲に軽度のPrP^{res}沈着を認めたのみで、錐体細胞層、顆粒細胞層に沈着は認められなかった。その他部位の脳では、IC群と比較すると軽度の傾向があったが瀰漫性に中等度から重度のPrP^{res}沈着を認め、脳幹部ではIC群と同程度の中程度のPrP^{res}沈着を認めた。脊髄では灰白質においてIC群と同程度の重度のPrP^{res}沈着を認めた(図1)。

230dpiで計画殺したIC群の個体では、脳のどの部位でも空胞変性はほとんど認められなかった。小脳回および小脳溝の顆粒層に軽度から中等度のPrP^{res}沈着が点状から斑状に認められたが顆粒細胞の脱落はみられず、分子層へのPrP^{res}沈着はわずかであり3層ともよく保存されていた。大脳皮質および海馬周辺に軽度の沈着を認め、脳幹

部や扁桃体に軽度から中等度の沈着を認めた（図1）。神経系の空胞形成、PrP^{res}の蓄積結果については図2の模式図に示した。

IC群ではGALTおよび脾臓を含む全身のリンパ装置、副腎などの内分泌系（Fig.5 c）、消化管神経叢などの末梢神経系において、PrP^{res}の沈着を認めなかった（図3）。

IP群ではGALTおよび脾臓において細顆粒状の軽度のPrP^{res}沈着を認めた。また、副腎皮質において瀰漫性に細顆粒状の軽度のPrP^{res}沈着を認めた。さらに、胃から直腸にかけての全域で消化管神経叢に中等度のPrP^{res}沈着を認めた（図3）。

肝臓、腎臓、心臓、肺、膵臓、子宮、乳腺、舌、横隔膜、骨格筋（前肢、後肢、内腸腰筋、胸最長筋、腰最長筋）ではIC群およびIP群ともにPrP^{res}沈着は認めなかった。

D. 考察

今回、IC群の病末期モルモット小脳では過去の報告と同様に、顆粒細胞の減少と分子層の空胞変性を伴う皮質の萎縮、グリオシスなどの特徴的な病変が形成されたが、IP群モルモット小脳において空胞変性はほとんどみられず、萎縮病変も認められなかった。IC群小脳の経時的な観察により、PrP^{res}沈着部位では顆粒層から分子層へとプリオン沈着が広がる傾向が認められ、投与230日後のIC群小脳においては顆粒層にPrP^{res}沈着が限局し空胞変性および皮質の萎縮は認められず、IP群小脳に類似していた。今回IC群およびIP群では脳幹部、視床での空胞変性およびプリオン沈着は中等度～重度と同程度であったことから、IP群小脳でのPrP^{res}沈着レベルはIC群の病末期で観察される小脳特徴病変の前段階である可能性が考えられた。つまり、IP群では親和性の高い小脳顆粒層への沈着はみられたものの、PrP^{res}複製が進行し小脳皮質が障害されて萎縮病変が形成される前にCTAが障害され斃死した可能性が考えられた。

IC群の海馬および海馬体では顆粒細胞層、錐体細胞層を中心に中等度の空胞変性およびPrP^{res}沈着が認められたが、IP群では認められなかった。海馬はBSE自然感染例および経口感染例でPrP^{res}脳内分布を調べた報告で沈着が認められない、もしくは沈着レベルが低く、脳内で比較的親和性（neuronal tropism）が低い部位である可能性が考

えられる。その一方、様々なプリオン株を用いた脳内接種実験では海馬や脳梁に重度の沈着が認められることが報告されている。今回のように接種ルートによりPrP^{res}脳内分布の違いが生じることは、脳内に達するPrP^{res}量の差、接種部位からの物理的な距離および脳内に入る経路の差、PrP^{res}の脳部位に対する向性が影響している可能性が考えられる。今回IC群での経時的観察により、接種部位の近接部分からPrP^{res}沈着が広がる様子は観察されなかったため、単に接種部位からの距離の差により病変の違いが生じたとは考えられなかった。すなわち、今回IC群では脳内に短期間に多量のPrP^{res}が脳内に到達したことで、CTAが障害される前に親和性の低い海馬にまで沈着し、親和性の高いと考えられる小脳顆粒層ではより重度に沈着することで萎縮病変が形成された。一方、IP群では末梢から脳幹部へ徐々にプリオンが伝播し脳内にプリオンが到達してから早期にCTAが障害され斃死した。そのため海馬および小脳皮質のPrP^{res}の分布が異なると考えられた。

IC群とIP群ではPrP^{res}の全身分布が大きく異なっていた。齧歯類モデルを用いてBSE株をIC投与した実験、スクレイピー株をIC投与した実験などでは脾臓にプリオン沈着を認める。これは脳脊髄液に乗った循環による結果、遠心性の伝播により脾臓の末梢神経から濾胞樹状細胞に伝達された結果などの可能性が考えられている。しかし今回、IC群ではリンパ系組織、末梢神経にプリオンの沈着を認めなかった。このことから、BSE株感染モルモットでは遠心性のプリオン伝播は起きないか、もしくは非常に遅いことが推察され、IP群でのみ認められた消化管神経叢、リンパ系組織、副腎でのプリオン沈着は求心性の伝播の結果であると考えられた。

E. 結論

中枢神経系におけるBSEプリオンの分布や病態は感染ルートにより異なる。モルモット感染モデルではBSEプリオンは中枢から末梢への遠心性の伝播はみられず、末梢から中枢へ求心性に伝播する性状をもつ。

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. 小脳、海馬における PrP^{res} の分布

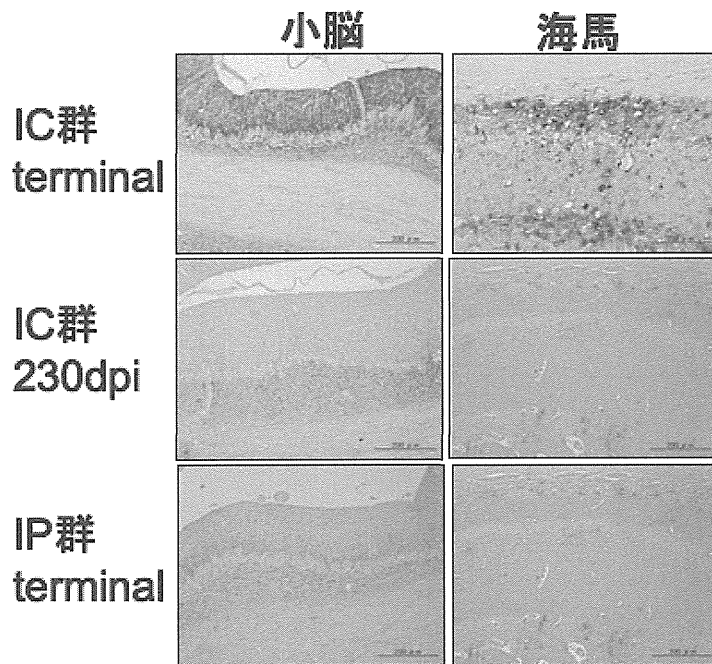


図 2. 脳内 PrP^{res} の分布

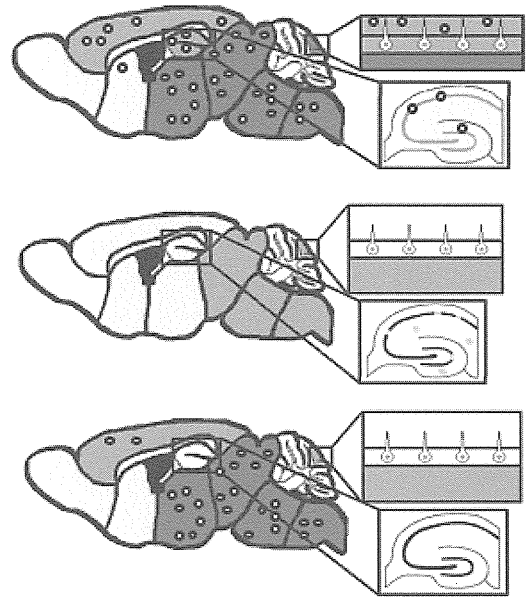
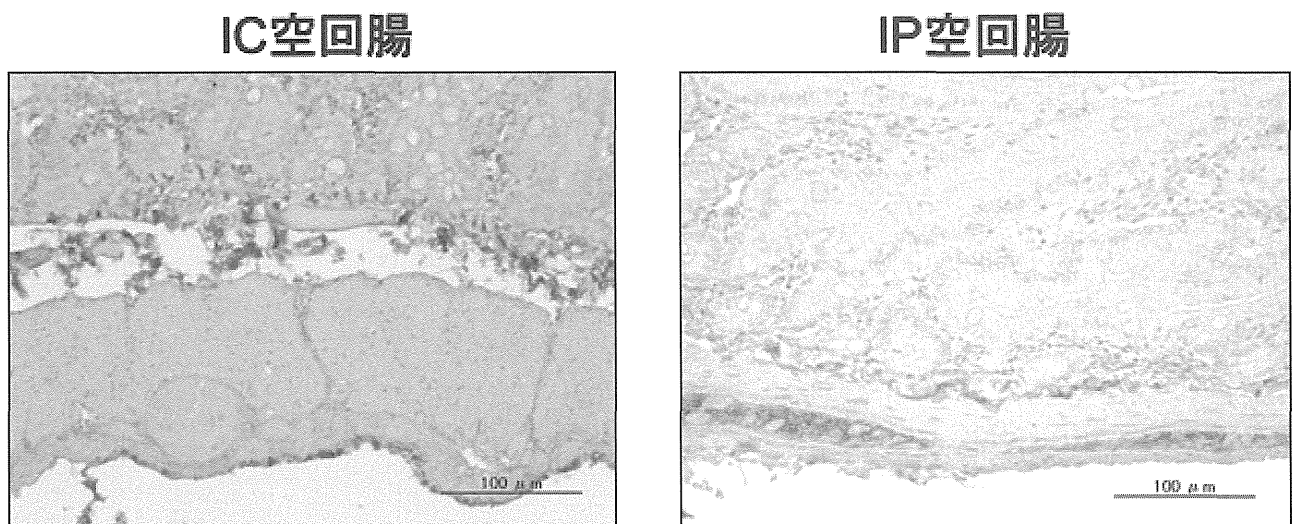


図 3. 消化管神経叢における PrP^{res} 沈着



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 インフルエンザ・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、千葉科学大学・危機管理学部)
萩原 健一 (国立感染症研究所・細胞化学部)

研究要旨 本研究は、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 法により PrP^{Sc} の体内分布・動態を明らかにすることを目的とする。これまでに、感染サルは血漿や尿から PrP^{Sc} が検出されることを報告した。本年度は、診断材料として体液の有用性を確認するため、脳内接種継代サルの体液における PrP^{Sc} の動態を解析した。BSE 感染サル 2 頭から、未発症期、発症初期、発症後期および解剖時に脳脊髄液、唾液、血液、尿を採取し、連続 PMCA 法により PrP^{Sc} を増幅した。尿中 PrP^{Sc} は 2 頭とも発症の 2～3 ヶ月前から検出された。未発症時では、血漿 (#20 サル)、脳脊髄液および唾液 (#21 サル) からも PrP^{Sc} が確認された。L 型非定型 BSE 感染カニクイザルの PrP^{Sc} の増幅条件を検討した結果、ヘパリンおよび poly A 存在下、処理温度と超音波照射条件を段階的に変更するマルチステップ PMCA により、10% 感染脳乳剤を 10⁶ 倍に希釈したサンプルまで PrP^{Sc} が検出可能になった。

A. 研究目的

これまでに、定型 BSE を接種したカニクイザルに由来する異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の 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 BSE 感染サルに適用し、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) BSE 脳内接種継代サル

霊長類医科学研究センターで作出された定型 BSE 脳内接種サル (#7) から、脳内接種により継代した 3 代目のサル (#20 および #21) を解析した。これらサルは接種後、400 日前後で発症した。未発症期 (接種後 316～337 日)、発症初期 (421～424 日)、発症後期 (525 日) および解剖時 (542, 552 日) に採材された体液類 (血清、血漿、白血球分画、脳脊髄液、唾液および尿) を霊長類医科学研究センターより導入した。

2) 体液における PrP^{Sc} 分布と動態

体液類はリンタングステン酸 (PTA) 沈殿法により 10～67 倍に濃縮した後、シードとして用いた。白血球分画 (3～8 × 10⁶/lane) は可溶化し、遠心上清を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) L型非定型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、poly A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インフルエンザ・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) BSE脳内接種継代サルの体液類におけるPrP^{Sc}の分布と動態

尿中PrP^{Sc}は#20、#21サルとも未発症期から継続して検出された(図1A)。PrP^{Sc}シグナル検出に必要な増幅回数および濃縮倍率から、未発症期の尿サンプルに含まれるPrP^{Sc}量は感染脳乳剤(10%)を 10^{11} ~ 10^{13} 倍に希釈した場合に相当すると推定された。#21サルでは、未発症期から脳脊髄液および唾液からも継続的にPrP^{Sc}が検出され、未発症期のPrP^{Sc}量は尿よりも高く、 10^{10} ~ 10^{11} 倍希釈に相当すると推定された(#20はサンプルなし)。

血漿中のPrP^{Sc}の動態は2頭のサルで異なっていた。#20サルでは、未発症期から継続的にPrP^{Sc}が検出されたのに対して、#21サルでは、解剖時に採取したサンプルのみから検出可能であった(図1B)。また、白血球分画では、2頭とも解剖時に採取されたサンプルのみから検出した。

2) L型非定型BSE感染サル由来PrP^{Sc}の増幅

昨年度、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。ヘパリン単独、あるいはヘパリンおよびpoly A存在下で増幅を継続したところ、6回目の増幅以降、 10^4 希釈サンプルにシグナルが認められ、特にヘパリンおよびpoly A存在下では、9回の増幅により 10^6 希釈サンプルまでPrP^{Sc}が検出可能となった(図2)。

D. 考察

本研究で、定型BSE感染サルの体液を用いてPMCA解析したところ、脳脊髄液、唾液、血漿、血清、尿からPrP^{Sc}を検出した。また唾液や尿では未発症時に検出される例があった。PMCA法により、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)患者の尿からPrP^{Sc}が検出された例が報告されており、尿は診断材料として有用かも知れない。#20サルでは、尿に加えて、血漿からも未発症時にPrP^{Sc}が検出されており、PrP^{Sc}が血液から漏出した可能性がある。一方、#21サルでは血漿中PrP^{Sc}は解剖時に採取したサンプルだけに検出されたことから、尿中PrP^{Sc}は腎臓を含む体組織に由来する可能性も考えられる。今回、唾液中からPrP^{Sc}をはじめ検出したが、#21サルでは未発症時からPrP^{Sc}が検出された。継代によりBSEプリオンのサルに対する適合度が上がり、PrP^{Sc}が中枢神経組織で急速に拡大・増幅したため、早期に唾液腺に下降した可能性がある。白血球分画におけるPrP^{Sc}検出時期は初代接種と同様、感染末期に検出された。

L型非定型BSE感染サル由来PrP^{Sc}のPMCAによる増幅効率、L型非定型BSE感染牛由来のPrP^{Sc}と同様、定型BSE PrP^{Sc}の増幅効率に比べて低い。両PrP^{Sc}とも、希釈倍率が高くなると増幅能を持ったPrP^{res}が出現するまで長時間を要する(連続PMCAにおけるラウンド数が多く必要)、という点が共通している。L型非定型BSE由来PrP^{Sc}では、シード活性の発現に定型BSE PrP^{Sc}に比べて、より多くのPrP^{Sc}数が必要なのかも知れない。L型非定型BSE由来PrP^{Sc}の効率的な増幅には増幅初期段階のタイムラグを解消する手段が必要である。

E. 結論

PMCA法により、定型BSE感染サルの脳脊髄液、