

and transferrin receptor (TfR), and the early endosome marker, EEA1 (Fig. 3b). These results indicate that, in prion-infected cells, PrP^C is aberrantly present in the Golgi apparatus and only a small proportion of it can enter into the post-Golgi vesicular transport pathway.

We confirmed if PrP molecules aberrantly accumulated in the Golgi apparatus in prion-infected cells are PrP^C rather than PrP^{Sc}, by transfecting the expression vector encoding hamster or human PrP^C into uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3 and cured N2aC24L1-3 cells. Human and hamster PrP^Cs do not undergo structural conversion into PrP^{Sc} in cells infected with mouse-derived prions. Indeed, no PK-resistant human and hamster PrPs were detected on WB of the transfected N2aC24L1-3 cells using 3F4 anti-PrP Ab, which specifically detects hamster and human PrPs (Supplementary Fig. S3a,b). However, aberrant staining of hamster and human PrP^C near the nucleus was observed in infected cells, but not in uninfected or cured cells (Supplementary Fig. S3c).

Most PrP^{Sc} is in recycling endosome in infected cells. To investigate the mechanism of prion infection-induced impairment of post-Golgi vesicular trafficking, we investigated subcellular localization of PrP^{Sc} in infected cells by performing PrP^{Sc}-specific IHC with anti-PrP monoclonal Ab mAb132. The mAb132 was demonstrated to recognize the residues 119–127 of mouse PrP, and specifically visualize PrP^{Sc} under partially denatured conditions²⁵. No signals were detected in uninfected N2aC24 and cured N2aC24L1-3 cells (Fig. 4a). In contrast, strong signals were observed near the nucleus in infected N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells (Fig. 4a). The signals were not costained with the nuclear membrane marker lamin (Fig. 4a). We also costained PrP^{Sc} with other organelle markers. Only a small proportion of PrP^{Sc} were costained with giantin and TGN38 (Fig. 4b). In contrast, most PrP^{Sc} were costained with Rab11, TfR, EEA1 and the late endosome marker Rab9 (Fig. 4b). The strongest staining of PrP^{Sc} was observed in the TfR-positive recycling endosome (Fig. 4b). We found similar staining of PrP^{Sc} in N2aC24Chm cells (Fig. 4b). These results indicate that in infected cells, PrP^{Sc} is mainly accumulated throughout endosomal compartments and particularly abundantly in the TfR-positive recycling endosome, but little in the Golgi apparatus. Recycling endosome might consist of distinct compartments. Thus, PrP^{Sc} could be preferentially accumulated in a distinct compartment(s), such as the TfR-positive recycling endosome compartment.

Surface attractin is reduced in infected cells. We asked whether impaired post-Golgi vesicle transport could be relevant to the pathogenesis of prion diseases. Loss of attractin function was shown to cause prion disease-like spongiform changes in the brains of animals²². Therefore, we semi-quantified cell surface attractin in uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3 and cured N2aC24L1-3 cells, using biotin labelling of cell surface proteins. The surface expression of attractin was reduced in infected cells, compared with uninfected cells (Fig. 5a,b). The reduced surface expression of attractin was recovered in cured cells (Fig. 5a,b). Total attractin was the same for all three groups of cells (Fig. 5a,b), indicating that the reduced surface expression of attractin in infected cells is not due to downregulation of attractin expression. These results indicate that prion infection could reduce the cell surface expression of attractin.

Surface IR and insulin signal are reduced in infected cells. To further assess the relevance of the impaired post-Golgi trafficking to the pathogenesis of prion diseases, we asked whether the reduced surface expression of membrane proteins could disturb

downstream signalling in infected cells. The IR-mediated signal is neuroprotective and its impaired signal may be involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders^{14–17}. We thus semi-quantified the cell surface expression of the α -subunit of insulin receptor (IR α) in uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3 and cured N2aC24L1-3 cells using biotin labelling of cell surface proteins. The surface expression of IR α was reduced in infected cells, compared with uninfected cells (Fig. 6a,b). The reduced expression of the molecule was recovered in cured cells (Fig. 6a,b). IHC revealed that the molecule was aberrantly accumulated in the Golgi apparatus, which was stained with anti-GM130 Ab, in infected cells but not in uninfected or cured cells (Fig. 6c). These results indicate that prion infection could reduce the cell surface expression of IR α by impairing post-Golgi trafficking.

We then investigated whether reduced surface expression of IR α could affect the downstream signal in infected cells. Upon binding of insulin to the receptor, the β -subunit of the receptor (IR β) undergoes autophosphorylation of tyrosine residues at 1,150 and 1,151 in the intracellular domain. Therefore, we assessed the phosphorylation level of IR β in infected cells using WB with a mAb able to recognize the epitope including these phosphorylated tyrosine residues. Increased levels of the phosphorylated IR β were observed in these cells after stimulation with insulin (Fig. 6d,e). However, the phosphorylation level was much lower in infected cells than in uninfected or cured cells (Fig. 6d,e). These results indicate that reduced surface expression of the IR could weaken the insulin signal in infected cells.

Surface PrP^C, IR and attractin are reduced in ScN2a cells. Infected N2aC24L1-3 cells overexpress exogenously transfected mouse PrP^C, raising the possibility that impaired post-Golgi trafficking, eventually reducing surface expression of membrane proteins, might be due to the overexpression of PrP^C but not to prion infection. ScN2a cell line is a widely used prion-infected N2a cell line that expresses endogenous PrP^C alone (Supplementary Fig. S4a). To rule out the possibility, we semi-quantified the cell surface expression of PrP^C, the IR α and attractin in uninfected N2a and ScN2a cells using biotin labelling of cell surface proteins. Surface expression of all of the molecules was significantly reduced in ScN2a cells, compared with those in uninfected N2a cells (Supplementary Fig. S4b–g). These results clearly indicate that the impaired post-Golgi trafficking detected in infected N2aC24L1-3 cells is due to prion infection not due to the overexpression of PrP^C.

Prions reduce surface PrP^C and IR in mouse brains. We finally asked whether the post-Golgi trafficking of membrane proteins is impaired in prion-infected brains. We thus investigated the surface expression levels of PrP^C and IR α in the brains of mice infected with RML and 22L prions. Coronal sliced fresh brains removed from terminally ill mice were subjected to surface biotin labelling (Fig. 7a). Total IR α was the same for both uninfected and infected brains, and total PrP was increased in infected brains due to accumulation of PrP^{Sc} (Fig. 7b–d). However, biotinylated IR α and PrP^C were significantly lower in infected brains than in uninfected brains (Fig. 7b–d), indicating that surface expression of PrP^C and IR α was decreased in infected brains. We also investigated another GPI-anchored membrane molecule, Thy-1 (ref. 26), and two multipass transmembrane molecules, the glutamate receptor subunits GluR3 and NR1 (ref. 27), for their surface levels in infected brains. Surface expression of Thy-1 was significantly reduced in infected brains compared with uninfected brains (Supplementary Fig. S5a,b). In contrast, GluR3 and NR1

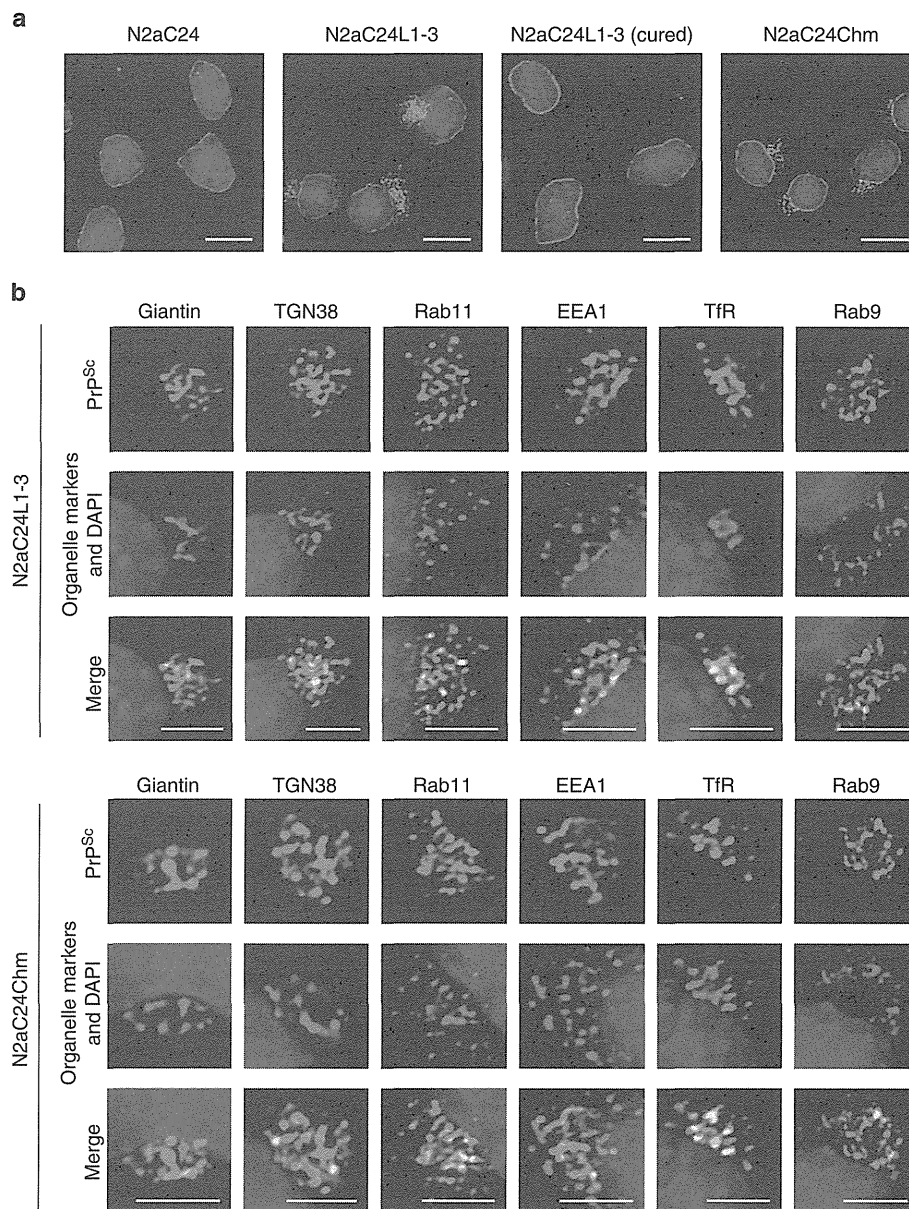


Figure 4 | Subcellular localization of PrP^{Sc} in infected cells. (a) PrP^{Sc} (green) was detected using mAb132 in infected N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells under partially denatured conditions. No signals were detected in uninfected N2aC24 and cured N2aC24L1-3 cells. In contrast, strong signals corresponding to PrP^{Sc} were detected in infected N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells. The nuclear envelope was stained with anti-lamin A Ab (red). The nucleus was stained with DAPI (blue). **(b)** PrP^{Sc} was costained with the *cis*-Golgi marker giantin, the *trans*-Golgi network marker TGN38, the recycling endosome markers Rab11 and TfR, and the early endosome marker EEA1, and the late endosome marker Rab9 in infected N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells. PrP^{Sc} is mainly accumulated throughout endosomal compartments, particularly abundantly in the TfR-positive recycling endosome, but little in the Golgi apparatus. Green fluorescence, PrP; blue fluorescence, nucleus; red fluorescence, the organelle markers; yellow fluorescence, combined signals. Scale bars 5 μm.

were similarly expressed on the cell surface of both uninfected and infected brains (Supplementary Fig. S5a,c,d). These results indicate that prion infection could impair the post-Golgi trafficking of some but not all membrane proteins.

We then addressed whether or not post-Golgi trafficking could be affected in infected brains of symptom-free mice, by similarly assessing the surface levels of IR α and PrP^C in infected brains removed at 2, 62–68 and 80–87 days post inoculation (dpi) with RML prions. The inoculated mice developed the disease around at 112 dpi. PrP^{Sc} was detected at 68 dpi, with increased amounts at

87 dpi, reaching its maximal level at the terminal stage (Supplementary Fig. S6a). No difference was observed in the levels of surface IR α and PrP^C in uninfected and infected brains at 2 dpi (Supplementary Fig. S6b–d). However, at 80–87 dpi, the surface IR α and PrP^C were significantly lower in infected brains than in uninfected brains (Supplementary Fig. S6b–d). They also appeared lower in infected brains at 62–68 dpi (Supplementary Fig. S6b–d). These results indicate that post-Golgi trafficking is impaired in infected brains of mice well before the onset of clinical symptoms.

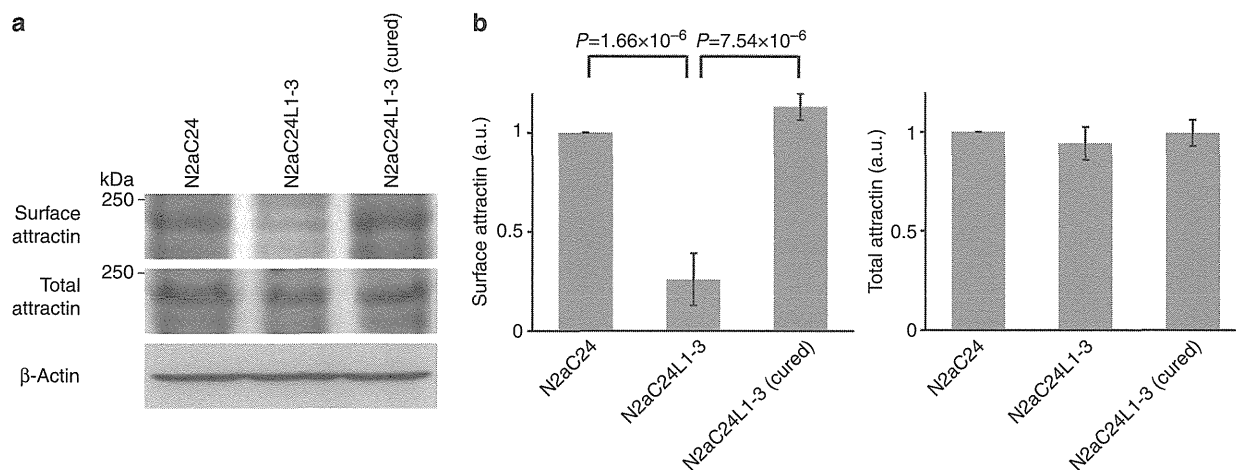


Figure 5 | Decreased surface attractin in infected cells. (a) WB of biotin-labelled surface attractin and total attractin in uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3, and cured N2aC24L1-3 cells. Surface expression of attractin was reduced in infected N2aC24L1-3 cells, compared with uninfected N2aC24 and cured N2aC24L1-3 cells. No reduction of total attractin was detected in infected N2aC24L1-3 cells. β -Actin is an internal control. (b) Signal densities for attractin in each lane against those for β -actin were statistically analysed from three independent experiments using the Student's *t*-test. Error bars, s.d.

Discussion

In the present study, we showed that post-Golgi vesicular trafficking was delayed in N2a cells persistently infected with 22L or Chandler prions, N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells. This delayed trafficking was successfully rescued in cured cells, clearly indicating that it is due to the prion infection. Impairment of the vesicle trafficking could have adverse effects because membrane proteins important for normal cellular functions, such as adhesion molecules, ion channels, or receptors, may not be correctly delivered to the plasma membrane. Indeed, we found that membrane proteins examined, including PrP^C, IR α and attractin, had reduced surface expression in infected N2aC24L1-3 cells. We also showed that surface expression of PrP^C, IR α and attractin were reduced in prion-infected ScN2a cells. Furthermore, surface expression of PrP^C, IR α and Thy-1 were reduced in the brains of mice infected with RML and 22L prions. However, the surface expression of GluR3 and NR1 was not affected. PrP^C and Thy-1 are GPI-anchored molecules, IR and attractin are single-pass transmembrane molecules, and GluR3 and NR1 are multipass transmembrane molecules. These results suggest that prion infection might impair the post-Golgi trafficking of certain types of membrane proteins, causing neuronal dysfunctions associated with prion disease.

Mice tg for the GPI-anchored membrane protein PrP-EGFP, a fusion protein of PrP with EGFP, were reported to exhibit aberrant accumulation of PrP-EGFP in the Golgi apparatus in neurons after infection with RML prions⁹. PrP-EGFP itself did not undergo conformational conversion and therefore failed to support prion propagation in mice⁹. These results reinforce our conclusion that prion infection could disturb the post-Golgi trafficking of membrane proteins to the cell surface, inducing aberrant accumulation of them in the Golgi apparatus. Interestingly, accumulation of PrP-EGFP in the Golgi apparatus in the mice was observed from the early stages after infection⁹, suggesting that impairment of post-Golgi trafficking might be an early pathogenic event in prion disease. Consistent with this idea, we showed that the surface expression of IR α and PrP^C was reduced in infected mouse brains well before the onset of clinical symptoms.

It remains controversial whether loss-of-function of PrP^C is involved in the pathogenesis of prion disease. We previously

found demyelination in the spinal cord and peripheral nerves of *Prnp*^{0/0} mice regardless of the ectopic expression of a PrP-like molecule, Dpl²⁸. Other investigators reported that *Prnp*^{0/0} mice displayed altered sleep patterns and circadian rhythms, and impaired long-term potentiation thought to be an electrophysiological mechanism underlying defective memory and learning^{29,30}. These abnormal phenotypes in *Prnp*^{0/0} mice are often reported in patients affected with prion diseases. However, *Prnp*^{0/0} mice developed neither spongiform neurodegeneration nor neuronal cell loss³¹. Therefore, loss-of-function of PrP^C might be responsible for only some aspects of the pathogenic features in prion diseases, such as those observed in *Prnp*^{0/0} mice, but not for spongiform degeneration and neuronal cell death. PrP^C is synthesized in the ER, transits the Golgi apparatus and is delivered to the cell surface, where it resides in lipid rafts, suggesting that PrP^C might play roles as a membrane receptor and adhesion molecule. We showed that the surface expression of PrP^C was reduced in infected N2aC24L1-3 and ScN2a cells and in infected mouse brains. It is thus possible that the reduced surface expression of PrP^C might lead to its functional deficiency in prion-infected cells, thereby causing some aspects of the pathogenic features in prion diseases, such as those observed in *Prnp*^{0/0} mice.

Spongiform neurodegeneration is a pathological hallmark of prion diseases. Loss-of-function for attractin, a large transmembrane protein that is conserved among animals, is known to cause prion disease-like spongiform neurodegeneration²². Similar spongiform neurodegeneration is reported in mice lacking functional mahogunin, a cytosolic E3 ubiquitin ligase, suggesting that mahogunin is a downstream molecule of attractin³². Mahogunin has already been shown to be functionally impaired by binding to CtmPrP or cytosolic PrP, suggesting that functional deficiency of mahogunin might be involved in spongiform formation in prion disease³³. Here, we showed that cell surface expression of attractin was reduced in prion-infected cells due to impairment of post-Golgi trafficking. These results suggest that impairment of post-Golgi trafficking might be involved in spongiform degeneration in prion diseases by causing functional impairment of the attractin/mahogunin pathway in prion-infected neurons.

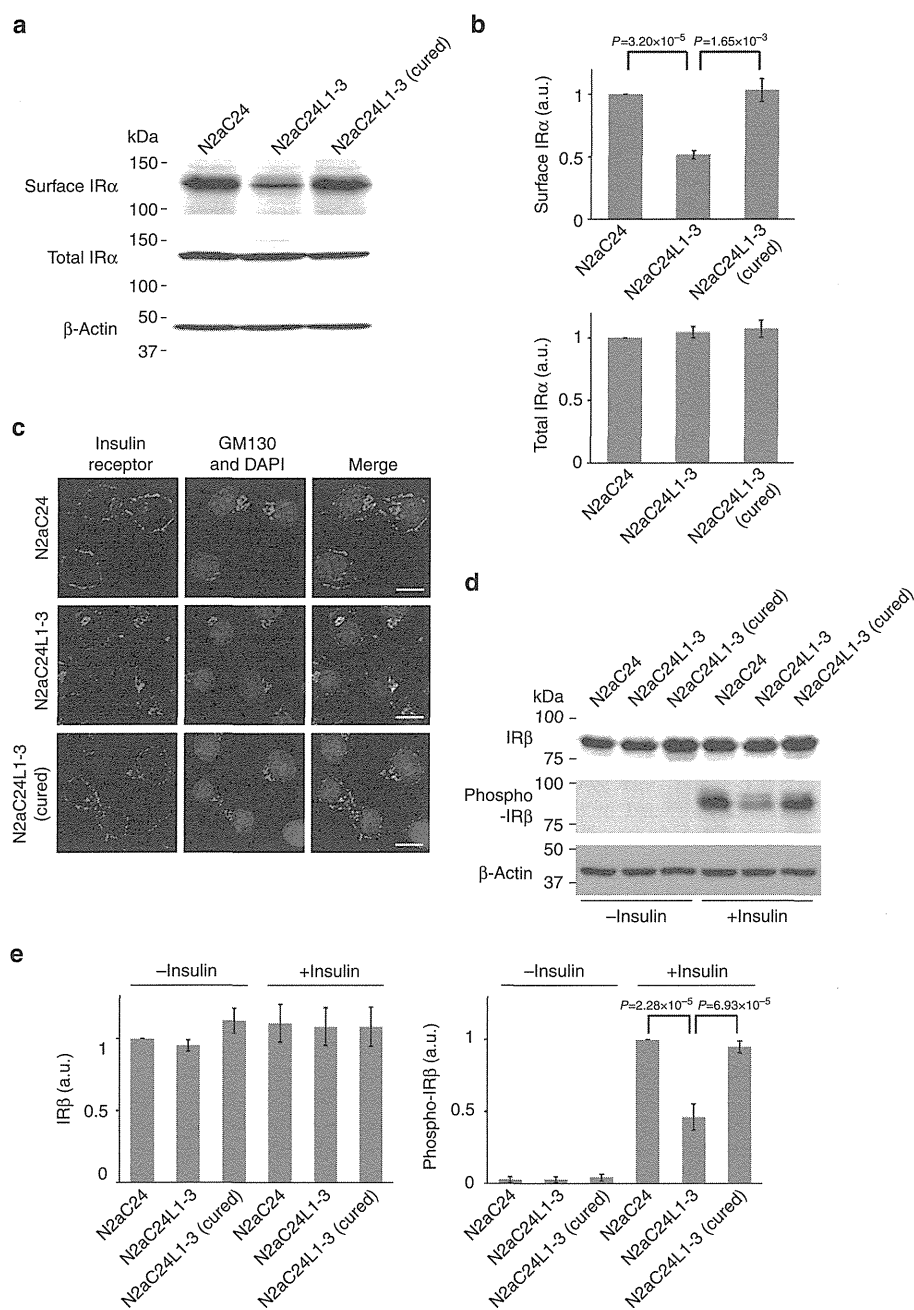


Figure 6 | Suppressed insulin signal in infected cells. (a) WB of biotin-labelled surface IR α and total IR α in uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3 and cured N2aC24L1-3 cells. Surface expression of IR α was reduced in infected N2aC24L1-3 cells, compared with uninfected N2aC24 and cured N2aC24L1-3 cells. No reduction of total IR α was detected in infected N2aC24L1-3 cells. β -Actin is an internal control. (b) Signal densities for the subunit in each lane against those for β -actin were statistically analysed from three independent experiments using the Student's *t*-test. Error bars, s.d. (c) IHC of IR α (green) and the Golgi marker GM130 (red) in uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3 and cured N2aC24L1-3 cells. IR α was costained with the Golgi marker GM130 in infected N2aC24L1-3 cells, but not in uninfected N2aC24, and cured N2aC24L1-3 cells. Blue fluorescence, nucleus; yellow fluorescence, combined signals. Scale bars 10 μ m. (d) WB of total IR β and phosphorylated β -subunit (phospho-IR β) in uninfected N2aC24, infected N2aC24L1-3 and cured N2aC24L1-3 cells after insulin stimulation. Total amounts of IR β were similar among these different cell types. However, insulin-stimulated autophosphorylation of IR β was suppressed in infected N2aC24L1-3 cells. β -Actin is an internal control. (e) Signal densities for IR β in each lane against those for β -actin were statistically analysed from three independent experiments using the Student's *t*-test. Error bars, s.d.

We also found that the cell surface expression of the IR α was reduced in infected N2aC24L1-3 and ScN2a cells and in infected mouse brains, and that autophosphorylation of the IR β was suppressed in infected N2aC24L1-3 cells after stimulation with

insulin. Reduced insulin signalling is suggested to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, by reducing its neuroprotective function and dysregulating synaptic plasticity and memory formation¹⁴⁻²¹.

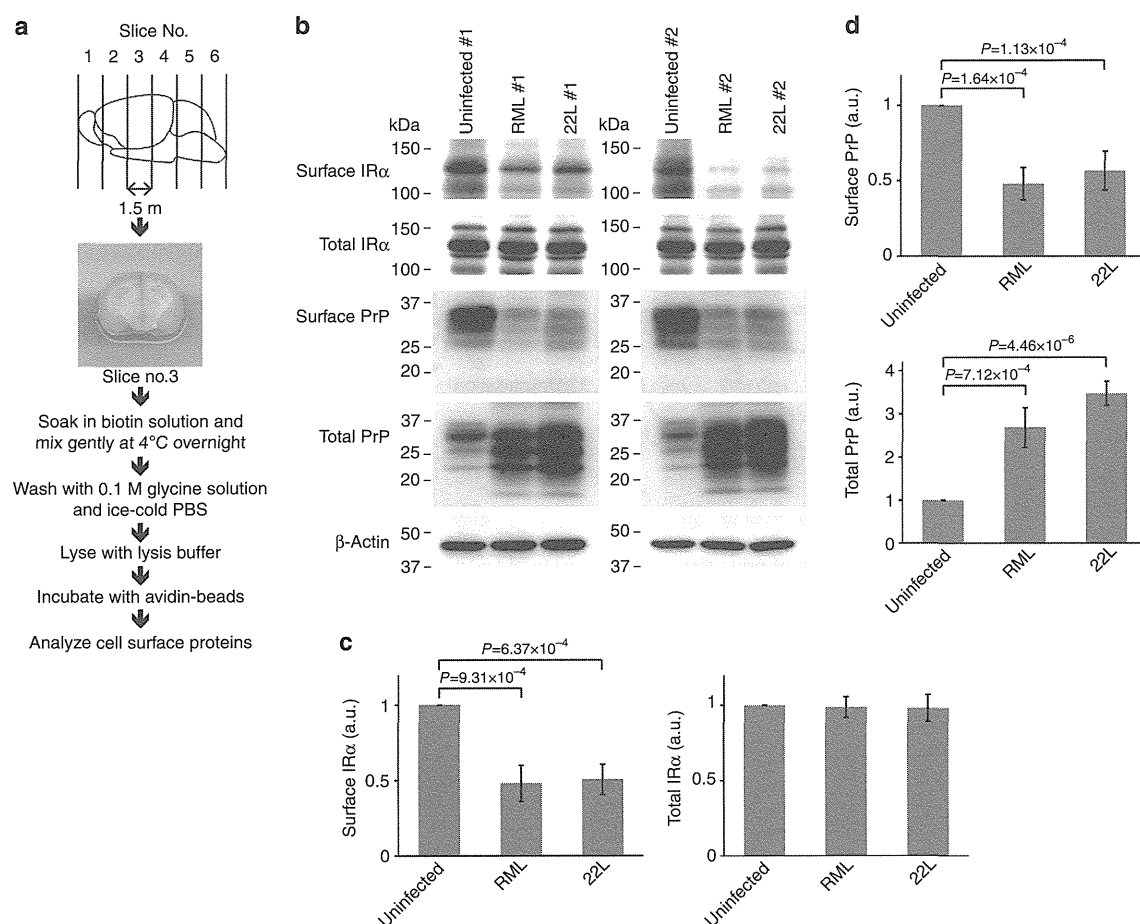


Figure 7 | Surface PrP^C and the insulin receptor is reduced in prion-infected mouse brains. (a) The simplified protocol for biotinylation of surface proteins in mouse brains. Brain tissues were removed from terminally ill mice infected with RML and 22L scrapie prions and from PBS-inoculated age-matched ICR mice at the same time, immediately sectioned into 1.5-mm-thick sections and then the surface proteins were biotinylated. The biotinylated proteins were analysed using WB. (b) WB of biotin-labelled surface IRα and total IRα, and biotin-labelled surface PrP^C and total PrP in the brains of mice infected with RML and 22L prions. The results were shown for two independent mouse brains from each group. PrP was detected with 6D11 anti-PrP Ab. Uninfected controls were PBS-inoculated age-matched mice. Total IRα was the same in uninfected and infected brains, and total PrP was increased in infected brains due to accumulation of PrP^{Sc}. However, biotinylated IRα and PrP^C were significantly lower in infected brains than in uninfected brains. β-Actin is an internal control. Signal densities for IRα (c) and PrP (d) in each lane against those for β-actin were statistically analysed for four independent mouse brains from each group using the Student's *t*-test. Error bars, s.d.

These results suggest that dysfunction of the insulin signal that is evoked by reduction of the cell surface expression of the IRα due to the prion infection-mediated impairment of post-Golgi vesicular trafficking might be involved in the pathogenesis of prion diseases.

We showed that PrP^C and IR were aberrantly accumulated in the Golgi apparatus. It has been reported that abnormal accumulation of membrane or secretory proteins in the Golgi apparatus could induce ER stress³⁴. Elevation of ER stress was reported in prion-infected cells and brains^{35,36}, suggesting that ER stress-mediated apoptosis might be responsible for neuronal cell death in prion diseases. Therefore, aberrantly accumulated membrane proteins, such as PrP^C and the IR, caused by the impaired post-Golgi vesicular trafficking might induce ER stress and eventually apoptosis in infected cells.

In contrast to the aberrant accumulation of PrP^C in the Golgi apparatus, only a very small proportion of PrP^{Sc} was detected in the Golgi apparatus of infected cells. This is consistent with previous reports by other investigators using other prion-infected

cells^{8,25}. Instead, most PrP^{Sc} was observed throughout endosomal compartments, being particularly abundant in recycling endosome in infected cells. Similar subcellular distribution of PrP^{Sc} was shown by others²⁵. Accumulation of PrP^{Sc} in recycling endosome was also shown in neurons of RML prion-infected mice³⁷. Membrane or secretory proteins synthesized in the ER were first transported to the Golgi apparatus and then to the plasma membrane either directly or via recycling endosome^{38,39}. Therefore, abnormal accumulation of PrP^{Sc} in recycling endosome could disturb vesicle transport from the Golgi apparatus to the recycling endosome and then to the plasma membrane (Fig. 8). Some proteins in recycling endosomes are retrograded to the Golgi apparatus⁴⁰. A small proportion of PrP^{Sc} also might be transported from the recycling endosome to the Golgi apparatus using the same pathway. Massignan *et al.*⁴¹ reported that the PrP mutant D178N/Met-129 linked to fatal familial insomnia was abnormally accumulated in the ER and Golgi apparatus of transfected N2a cells and impaired post-Golgi vesicular trafficking by inducing the Rab GDP dissociation

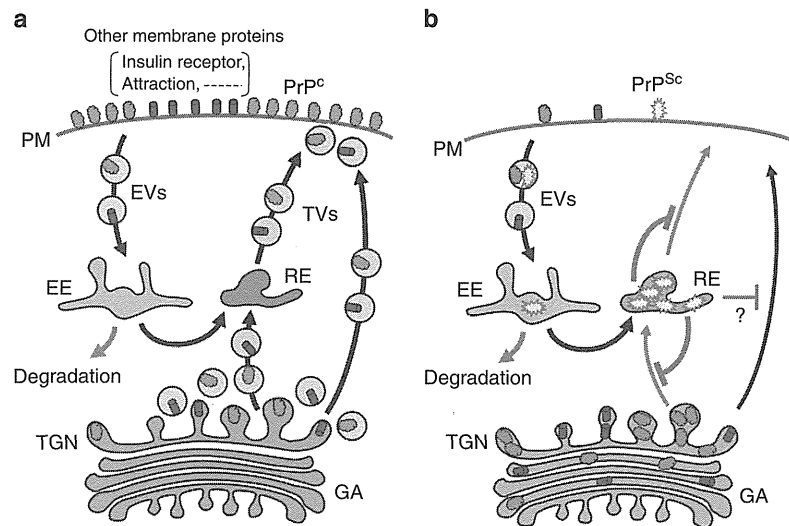


Figure 8 | A hypothetical pathogenic mechanism of prion disease. (a) In uninfected neurons, membrane proteins synthesized in the ER are normally delivered to the plasma membrane (PM) via the Golgi apparatus (GA) using a vesicular trafficking system. (b) In infected neurons, PrP^{Sc} preferentially accumulated at recycling endosomes (REs) impairs post-Golgi vesicular trafficking of membrane proteins, such as PrP^c, IR and attractin, to the PM, causing functional deficiency of each molecule and finally inducing neuronal dysfunctions involved in the pathogenesis of prion diseases. EE, early endosome; EVs, endocytic vesicles; TGN, the trans-Golgi network; TVs, transport vesicles.

inhibitor α expression and, in contrast, by reducing Rab11. These results suggest that impairment of the post-Golgi trafficking also could be involved in the pathogenesis of hereditary prion diseases. However, the accumulation site for PrP^{Sc} and the mutant PrP were different, suggesting different mechanisms underlying the disturbed post-Golgi vesicular trafficking in acquired and hereditary prion diseases.

In short, we showed here that prion infection could disturb the post-Golgi vesicular trafficking of some but not all membrane proteins to the cell surface, and suggested that the disturbed post-Golgi vesicular trafficking could eventually cause neuronal dysfunctions associated with the pathogenesis of prion disease. For further understanding of the pathogenesis of prion diseases and development of treatments for prion diseases, it might be worth investigating the molecular mechanism underlying the impaired post-Golgi vesicular trafficking in prion-infected cells.

Methods

Ethics statement. The Ethics Committee of Animal Care and Experimentation of The University of Tokushima approved this study (approval number 11002). Animals were cared for in accordance with The Guiding Principle for Animal Care and Experimentation of The University of Tokushima and Japanese Law for Animal Welfare and Care.

Abs and reagents. The Abs used in this study are: rabbit polyclonal anti-giantin (1:1,000) (Covance, Emeryville, CA), rabbit polyclonal anti-TGN38 (1:500) (Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-EEA1 (1:500) (Novus Biologicals), rabbit polyclonal anti-Rab11 (1:500) (Cell Signaling, Danvers, MA), rabbit monoclonal anti-Rab9 (D52G8) (1:500) (Cell signaling), rabbit monoclonal anti-IR β (4B8) (1:1,000) (Cell Signaling), rabbit monoclonal anti-phospho-IR (19H7) (Tyr1150/1151) (1:500) (Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-TfR (1:500) (Abcam, Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-IR α (1:200 for IHC, 1:500 for WB) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-attractin (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-GFP alexafluoro488 (1:1,000) (Invitrogen, Carlsbad, CA), rabbit polyclonal anti-VSV-G (1:1,000) (kindly gifted from Prof Nakamura, Kyoto Sangyo University), mouse monoclonal anti-GM130 (1:1,000) (BD transduction, San Diego, CA), mouse monoclonal anti- β -actin (1:2,000) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO), rabbit polyclonal anti-lamin A (1:200) (Sigma-Aldrich Inc.), rabbit polyclonal anti-Thy1 (1:1,000) (Cell Signaling), rabbit monoclonal anti-GluR3 (D47E3) (1:1,000) (Cell Signaling), mouse monoclonal anti-NR1 (CT) (1:500) (Millipore Corp., Billerica, MA), mouse monoclonal

anti-PrP (SAF32) (1:1,000) (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France), mouse monoclonal anti-PrP (SAF83) (1:1,000) (Bertin Pharma), mouse monoclonal anti-PrP (3F4) (1:1,000 for IHC, 1:2,000 for WB) and (6D11) (1:3,000) (Covance), mouse monoclonal 132 anti-PrP (1:10,000) (mAb132, kindly gifted from Prof Horiuchi, Hokkaido University), goat anti-mouse IgG AlexaFluoro488 (1:2,000) (Molecular Probes, Eugene, OR), goat anti-rabbit IgG Cy3 (1:1,000) (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ), goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) (1:3,000) (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), goat anti-rabbit IgG HRP (1:3,000) (GE Healthcare) and DyLight 649 donkey anti-rabbit IgG minimal X-reactivity Ab (1:1,000) (Biologend, San Diego, CA). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Sigma-Aldrich. Sulfo-NHS-LC-Biotin and NeutrAvidin UltraLink Resin were purchased from Thermo Scientific (Rockford, IL).

Cell lines. N2aC24, N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells were established elsewhere²³. N2a cells (ATCC CCL-131, kindly gifted from Prof Horiuchi, Hokkaido University) were permanently transfected with pEP1/Myc-His A (Invitrogen) encoding mouse PrP^c. N2aC24 cells were subsequently cloned from among G418-resistant colonies. N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells were obtained by limiting dilution of N2aC24 cells exposed to 22L and Chandler scrapie⁴². Cured N2aC24L1-3 and N2aC24Chm cells were established by incubation with anti-PrP SAF32 Ab at 2–4 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cells were tested for PrP^{Sc} by WB and if it was undetectable, they were maintained in the media minus Ab with occasional checks for PrP^{Sc}. ScN2a cells were a gift from Prof Doh-ura, Tohoku University. Cells were maintained at 37 °C with 5% CO₂ in air in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (FBS).

WB analysis. Cells or brain tissues were lysed in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) containing protease inhibitor cocktail (Nakalai Tesque Co., Kyoto, Japan), and protein concentration was measured by BCA assay kit (Pierce, Rockford, USA). Total proteins were treated with PK (20 $\mu\text{g mg}^{-1}$ total proteins) at 37 °C for 30 min. PK was inactivated by heating at 99 °C for 10 min in Laemmli's sample buffer. The samples were loaded into a SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were electrotransferred onto an Immobilon-P PVDF membrane (Millipore Corp.). The membrane was blocked in 5% skim milk in PBS containing 0.1% Tween 20 and incubated with first Ab followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab. Signals were visualized using Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corp.) and detected by LAS-4000 mini (Fujifilm Co., Tokyo, Japan).

Biotinylation of cell surface proteins. Cells (85–95% confluent) were washed with PBS three times and incubated with 2 ml of 1 mg ml⁻¹ Sulfo-NHS-LC Biotin (Thermo Scientific) in PBS for 30 min at room temperature (RT). The cells were then washed with 0.1 M Glycine in PBS three times and ice-cold PBS three times

and lysed in lysis buffer. Two milligrams of the total proteins were mixed with 10 μ l (bed volume) of NeutrAvidin UltraLink Resin (Thermo Scientific) for 4 h at 4 °C and the biotinylated protein–resin complexes were collected by brief micro-centrifugation. The complexes were then washed with the lysis buffer three times and heated at 99 °C for 10 min in 40 μ l of Laemmli's sample buffer to separate the biotinylated proteins from the complexes. The biotinylated proteins in the supernatant were subjected to WB.

For biotinylation of surface proteins in the brain tissues, brains were removed from terminally ill male ICR mice (Charles River Laboratories, Kanagawa, Japan) infected with RML and 22L scrapie prions and from PBS-inoculated age-matched male ICR mice simultaneously, immediately sectioned into 1.5-mm-thick segments using a mouse brain slicer (MB-SSC-5-C, Muromachi Kikai, Tokyo, Japan), and then soaked in 1 mg ml⁻¹ Sulfo-NHS-LC Biotin in PBS (pH 8.0) with gentle mixing at 4 °C overnight. The brain slices were washed with 0.1 M glycine in ice-cold PBS and then PBS only three times each, and homogenized in lysis buffer. Three milligrams of the total proteins were then mixed with 20 μ l (bed volume) of NeutrAvidin UltraLink Resin (Thermo Scientific) for 4 h at 4 °C. Other subsequent procedures are as described above.

Immunofluorescence analysis. Cells on coverslips were fixed in 3% para-formaldehyde for 15 min, treated with 0.1 M glycine in PBS for 10 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 4 min at RT. To detect PrP^{Sc}, the cells were treated with 5 M guanidinium thiocyanate for 10 min at RT²⁵. After washing with PBS, the cells were incubated with the first Ab in 5% FBS in PBS and then with fluorescent secondary Ab. After washing, the coverslips were mounted with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen). Fluorescent images were visualized using BIOREVO BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) and fluorescent intensity was analysed using a BZ-II analyzer (Keyence).

VSV-G(ts045)-GFP transport assay. Cells were transfected with a vector encoding VSV-G(ts045)-GFP⁴³ (kindly gifted from Prof Nakayama, Kyoto University) using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) and incubated at the non-permissive temperature of 39.5 °C for 16 h to allow accumulation of VSV-G(ts045)-GFP in the ER⁴⁴. The cells were then cultured at the permissive temperature of 32 °C in the presence of 100 μ g ml⁻¹ cycloheximide to induce transport of the already synthesized VSV-G(ts045)-GFP from the ER to the plasma membrane via the Golgi apparatus. The cells were fixed with 3% paraformaldehyde at various time points after the cell culture commenced at 32 °C, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and stained for VSV-G(ts045)-GFP using anti-GFP Ab. The Golgi apparatus and the nucleus were also stained using anti-GM130 Ab and DAPI, respectively. The fluorescent intensities of VSV-G(ts045)-GFP in the Golgi area, which was defined as a GM130-positive area, were measured as described above from randomly selected 14–16 cell fields at each time point. The fluorescent intensities of VSV-G(ts045)-GFP in the whole cells were also measured. Trafficking of VSV-G(ts045)-GFP in the cells was assessed as the kinetics of the protein in the GM130-positive Golgi area. The kinetics was defined as a change in the ratio of the fluorescent intensities of VSV-G(ts045)-GFP in the Golgi area to those in the whole cell over time.

FACS analysis of VSV-G(ts045)-GFP transport. Cells transiently transfected with the VSV-G(ts045)-GFP vector were cultured at 32 °C for 0 or 120 min with 100 μ g ml⁻¹ cycloheximide after being cultured at 39.5 °C for 16 h. The cells were then washed with ice-cold PBS three times and removed by pipetting. The cells were blocked by incubation at 4 °C for 30 min with 5% FBS in PBS. The cell surface VSV-G(ts045)-GFP was labelled with anti-VSV-G Ab (a gift from Prof Nakamura, Kyoto Sangyo University) at 4 °C for 1 h in 5% FBS-containing PBS without detergents. After three washes with ice-cold PBS, the cells were reacted with DyLight 649 donkey anti-rabbit IgG minimal X-reactivity Ab (Biolegend, San Diego, CA) at 4 °C for 1 h in 5% FBS-containing PBS. The cells were then washed three times with ice-cold PBS, resuspended in 1 ml of ice-cold PBS and analysed by FACS.

Insulin stimulation. Cells were washed with and incubated with KRH buffer (20 mM HEPES (pH 7.4), 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂) containing 0.1% (w/v) bovine serum albumin for 1 h at 37 °C. Insulin was then added at a final concentration of 10⁻⁷ M for 10 min. After washing with ice-cold PBS three times, the cells were lysed in lysis buffer containing 5 mM sodium vanadate, 10 mM β -glycerophosphate and 5 mM sodium molybdate, and subjected to WB.

Transfection. Cells were transiently transfected with pcDNA3.1 expression vectors (Invitrogen) encoding hamster or human PrP^C using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). The cells were lysed in lysis buffer 2 days after transfection and subjected to WB.

Statistical analysis. Data were analysed using the Student's *t*-test.

References

- Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 13363–13383 (1998).
- Bueler, H. *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339–1347 (1993).
- Prusiner, S. B. *et al.* Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 10608–10612 (1993).
- Manson, J. C., Clarke, A. R., McBride, P. A., McConnell, I. & Hope, J. PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* **3**, 331–340 (1994).
- Sakaguchi, S. *et al.* Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J. Virol.* **69**, 7586–7592 (1995).
- Gonatas, N. K., Stieber, A. & Gonatas, J. O. Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J. Neurol. Sci.* **246**, 21–30 (2006).
- Nakagomi, S. *et al.* A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **29**, 221–231 (2008).
- Dron, M., Dandoy-Dron, F., Salamat, M. K. & Laude, H. Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrP^{Sc} into aggregates within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 2050–2060 (2009).
- Barmada, S. J. & Harris, D. A. Visualization of prion infection in transgenic mice expressing green fluorescent protein-tagged prion protein. *J. Neurosci.* **25**, 5824–5832 (2005).
- Hegde, R. S. *et al.* A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827–834 (1998).
- Hegde, R. S. *et al.* Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* **402**, 822–826 (1999).
- Stewart, R. S. & Harris, D. A. A transmembrane form of the prion protein is localized in the Golgi apparatus of neurons. *J. Biol. Chem.* **280**, 15855–15864 (2005).
- Stewart, R. S., Piccardo, P., Ghetti, B. & Harris, D. A. Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J. Neurosci.* **25**, 3469–3477 (2005).
- Adamo, M., Raizada, M. K. & LeRoith, D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* **3**, 71–100 (1989).
- Diaz, B., Serna, J., De Pablo, F. & de la Rosa, E. J. *In vivo* regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**, 1641–1649 (2000).
- Mattsson, M. E., Hammerling, U., Mohall, E., Hall, K. & Pahlman, S. Mitogenically uncoupled insulin and IGF-I receptors of differentiated human neuroblastoma cells are functional and mediate ligand-induced signals. *Growth Factors* **2**, 251–265 (1990).
- Ryu, B. R., Ko, H. W., Jou, I., Noh, J. S. & Gwag, B. J. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. *J. Neurobiol.* **39**, 536–546 (1999).
- Hong, M. & Lee, V. M. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.* **272**, 19547–19553 (1997).
- Rensink, A. A. *et al.* Insulin inhibits amyloid beta-induced cell death in cultured human brain pericytes. *Neurobiol. Aging* **25**, 93–103 (2004).
- Gasparini, L., Netzer, W. J., Greengard, P. & Xu, H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 288–293 (2002).
- Nelson, T. J. & Alkon, D. L. Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1033–1036 (2005).
- Kuramoto, T. *et al.* Attractin/mahogany/zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 559–564 (2001).
- Fujita, K. *et al.* Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. *Cell. Mol. Neurobiol.* **31**, 999–1008 (2011).
- Park, J. J., Gondre-Lewis, M. C., Eiden, L. E. & Loh, Y. P. A distinct trans-Golgi network subcompartment for sorting of synaptic and granule proteins in neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Sci.* **124**, 735–744 (2011).
- Yamasaki, T. *et al.* Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119–127 of mouse PrP. *J. Gen. Virol.* **93**, 668–680 (2012).
- Barker, T. H. & Hagoood, J. S. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1793**, 921–923 (2009).
- Petralia, R. S., Rubio, M. E., Wang, Y. X. & Wenthold, R. J. Differential distribution of glutamate receptors in the cochlear nuclei. *Hear. Res.* **147**, 59–69 (2000).
- Nishida, N. *et al.* A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab. Invest.* **79**, 689–697 (1999).
- Collinge, J. *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295–297 (1994).

30. Tobler, I. *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639–642 (1996).
31. Bueler, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577–582 (1992).
32. He, L. *et al.* Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* **299**, 710–712 (2003).
33. Chakrabarti, O. & Hegde, R. S. Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. *Cell* **137**, 1136–1147 (2009).
34. Xu, Y. X., Liu, L., Caffaro, C. E. & Hirschberg, C. B. Inhibition of Golgi apparatus glycosylation causes endoplasmic reticulum stress and decreased protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 24600–24608 (2010).
35. Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. & Soto, C. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J.* **22**, 5435–5445 (2003).
36. Hetz, C. *et al.* The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J. Neurosci.* **25**, 2793–2802 (2005).
37. Godsave, S. F. *et al.* Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. *J. Neurosci.* **28**, 12489–12499 (2008).
38. Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–132 (2004).
39. Hsu, V. W. & Prekeris, R. Transport at the recycling endosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 528–534 (2010).
40. Chia, P. Z. & Gleeson, P. A. The regulation of endosome-to-Golgi retrograde transport by tethers and scaffolds. *Traffic* **12**, 939–947 (2011).
41. Massignan, T. *et al.* Mutant prion protein expression is associated with an alteration of the Rab GDP dissociation inhibitor alpha (GDI)/Rab11 pathway. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 611–622 (2010).
42. Atarashi, R., Sim, V. L., Nishida, N., Caughey, B. & Katamine, S. Prion strain-dependent differences in conversion of mutant prion proteins in cell culture. *J. Virol.* **80**, 7854–7862 (2006).
43. Kasai, K., Shin, H. W., Shinotsuka, C., Murakami, K. & Nakayama, K. Dynamin II is involved in endocytosis but not in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *J. Biochem.* **125**, 780–789 (1999).
44. Zilberstein, A., Snider, M. D., Porter, M. & Lodish, H. F. Mutants of vesicular stomatitis virus blocked at different stages in maturation of the viral glycoprotein. *Cell* **21**, 417–427 (1980).

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Horiuchi for N2a cells and mAb132, Prof. Doh-ura for ScN2a cells, Prof. Nakayama for VSV-G(ts045)-GFP vector, and Prof. Nakamura for anti-VSV-G Ab. This study was partly supported by a Grant-in-Aid from the BSE and other Prion Disease Control Project of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, Grants-in-Aid from the Research Committee of Prion Disease and Slow Virus infection, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and a Grant-in-Aid for TSE research (H23-Shokuhin-Ippan-005) and Research on Measures for Intractable Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. H.M. was partly supported by a Cooperative Research Grant of the Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima.

Author contributions

K.U. and S.S. designed the experiments and wrote the manuscript. K.U., N.M., M.Y., T.U. and H.M. performed the experiments.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Uchiyama, K. *et al.* Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat. Commun.* **4**:1846 doi: 10.1038/ncomms2873 (2013).

BSE の発生とその対策を振り返って

北海道大学大学院獣医学研究科 獣医衛生学教室 堀内基広

BSE の発生、及びその後の vCJD の発生は世界を不安に陥れたが、BSE に対する管理措置が有効に機能し、2009 年以降の発生数は世界全体を合計しても 100 例以下にまで減少した。その発生は世界的に管理下にあり、わが国でも 2002 年 2 月以降に生まれた牛で BSE は発生していない。BSE の発生は、欧州を中心に、世界的に食の安全対策が見直される契機となった。我が国でも、食品安全基本法の制定及び食品安全委員会による健康影響評価という、食の安全・安心に関して新たな枠組みが構築された。BSE の収束とともに、社会の関心も薄れているが、今一度 BSE の発生と対策について整理したい。

1. プリオン病

プリオン病は人のクロイツフェルト・ヤコブ病、羊のスクレイピーに代表される致死性の神経変性性疾患である。プリオン病の病原体「プリオン」の本体については、長年議論されてきたが、大腸菌で発現させた組み換えプリオンタンパク質から感染性のあるプリオンが産生可能なことから、主要構成要素はプリオンタンパク質 (prion protein, PrP) であることが証明されたと考えられる。実際には、異常型プリオンタンパク質 (Abnormal isoform of prion protein, PrP^{Sc}) のオリゴマーあるいは凝集体に感染性が付随する。

プリオン病は、その原因により、感染性、遺伝性、特発性 (原因不明)、の 3 種に分類される。動物のプリオン病は、自然状態あるいは人為的な感染によるかは別にして、感染性に分類される。このうち、スクレイピーはヒツジ間で、慢性消耗病は鹿科動物間で、自然状態で感染が成立する。

人のプリオン病は感染性、遺伝性、及び特発性の 3 種がある。このうち、特発性に分類される孤発性 CJD が 80-85% を占める。牛海綿状脳症 (Bovine spongiform encephalopathy, BSE) は、1980 年代半ばに英国で出現し大流行した。BSE は英国で出現後、欧州、北米及びアジアへ拡散した。1996 年、BSE が人に感染したことが原因と考えられる変異クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の存在が報告されてから、食生活を介して人が BSE に罹患して死に至るという恐怖のために、BSE は大きな社会問題となった。以降、プリオン病は食品媒介性感染症、人獣共通感染症として認識されるようになった。

2. 発生状況

BSE は 1985 年頃から英国で発生し、発生数は 1992 年にピークに達した。BSE の由来として、羊のスクレイピーが原因であるとする説と、元来稀ではあるが牛に存在していた病気であったとする説があるが結論は出ていない。英国では 1988 年 7 月に、反芻獣由来の肉骨粉を反芻獣に与えることを禁止する飼料規制 (ruminant feed ban to ruminants) を導入した。この飼料規制導入後 6 年が経過した 1994 年以降、BSE の発生は減少に転じた。1996 年に vCJD の存在が明らかとなり、世界的に不安が増大したが、BSE 管理措置は有効に機能しており、発生のピーク時 (1992 年) には年間 37,000 頭以上であった発生数が 2010 年には 11 頭までに減少した。ただし、英国のピーク時における BSE の発生数は臨床診断と病理組織学的検査による件数であり、仮に、ELISA やウエスタンブロット (WB) など、精度・感度の高い診断法を用いた場合、はるかに多い数の感染牛が摘発されたと考えられる。vCJD はこれまで英国で 177 例、英国以外の国で 51 例 (日本: 1 名) の報告があるが、英国での発生は 2000 年をピークに減少している (図 1)。

欧州諸国では 2000 年以降 BSE 牛の数が著しく増加したが、これは ELISA もしくは WB により牛の延髄門部に蓄積する PrP^{Sc} を検出する方法を導入してリスク牛および食用に供される健康と畜牛の BSE 検査を開始した結果である。後述するように、欧州諸国でも英国と同様の飼料規制を導入しており、2003-4 年をピークに BSE の発生数は減少している。

我が国では 2001 年 9 月に最初の BSE 牛が確認され、以降計 36 例が確認された。BSE 牛の多くは、出生後まもなく汚染飼料の給餌により感染を受ける。従って、BSE 牛の出生時期は、その当時の BSE プリオン汚染状況を反映する。我が国で摘発された BSE 牛の出生時期には二つのピークがある。一つは 1995-6 年生まれ、もう一方は 1999-2001 年生まれの牛である (図 2)。前者は BSE プリオンに汚染された飼料や油脂の輸入が原因と考えられるが、後者は、1995-6 年に輸入飼料が原因で BSE に感染した牛が国内でレンダリングされ、国内で BSE プリオン汚染肉骨粉が産生され、これにより国内で感染が

拡大したと推定される。BSE は自然状態で牛から牛に水平伝播しないので、感染源 (BSE 感染牛及びプリオン汚染飼料) と感染経路 (汚染飼料の摂食) を遮断できれば、確実に制圧できる。我が国で、2002 年 2 月以降に生まれた牛で BSE の発生がないことは、飼料規制を含む管理措置が有効に機能したことの証である。

3. BSE 感染牛でのプリオンの体内分布

BSE 感染牛でのプリオンの体内分布やその経時的変化を含めた感染病態の解明は、BSE に係るリスク評価を行ううえでの科学的知見として非常に重要である。英国獣医学研究所 (VLA)、ドイツの Friedrich-Loeffler-Institute (FLI)、及び日本の動物衛生研究所と新得畜産試験場では、牛を用いた感染試験および野外例の解析を行っており、病態に関する知見が集積しつつある。

BSE 牛由来脳乳剤を経口投与した牛の各臓器のプリオン感染性を、マウスを用いたバイオアッセイで調べた実験では、32 ヶ月以降の脳、脊髄、背根神経節、三叉神経節、6 ヶ月目の回腸遠位部にプリオンの感染性が確認された [1]。また、牛を用いたバイオアッセイでの調べで、扁桃でも低レベルながら感染性が見出された。スクレイピーも反芻動物のプリオン病であるが、BSE 感染牛とスクレイピーのヒツジでは、プリオンの体内分布が明らかに異なる。スクレイピー感染ヒツジでは中枢神経系以外にも、リンパ節、扁桃、粘膜下リンパ濾胞などのリンパ系組織や胎盤など非神経系の末梢組織にプリオンが容易に検出できるが、BSE 病原体は神経向性が強く、BSE 感染牛のリンパ系組織ではプリオンは稀に検出される程度である [1]。

羊スクレイピー、マウスやハムスターなどの実験動物におけるプリオンの経口投与から、経口ルートで侵入したプリオンは、消化管からパイエル氏板等の消化管付随リンパ濾胞の上皮に存在する M 細胞から体内に取り込まれ、リンパ濾胞にある濾胞樹状細胞で増殖するとともに、末梢神経へと移行し、副交感神経系 (迷走神経) を経て延髄に至る経路と、交感神経系 (内臓神経) を経て脊髄胸腰部に至る経路で、中枢神経系に侵入すると考えられている。牛を用いた感染実験の結果から、経口的に取り込まれた BSE 病原体は回腸遠位部に存在する集合パイエル氏板の濾胞上皮から体内に取り込まれ、同様の経路で中枢神経系に侵入することが示された [2]。

感染成立を考える上で、最小感染量の推定は重要である。VLA で実施された牛での BSE 経口投与試験では、野外発生例から推測されたように、投与量の減少とともに潜伏期間が延長し、BSE 感染牛脳 1mg 相当でも、15 頭中 1 頭で感染が成立した (図 3) [3]。脳乳剤の経口投与と動物組織の加熱処理により産生される肉骨粉の摂取による感染効率の差異は不明であるが、最小感染量は非常に低い。

BSE 感染後、中枢神経系組織で PrP^{Sc} が検出されるようになる時期、あるいは発症前どのくらいの時期から PrP^{Sc} が検出されるかという情報は、BSE 検査の対象月齢を考慮する上で重要である。BSE 経口感染牛では、BSE 感染牛脳 100g 相当を投与した場合、投与後 24 ヶ月以降、5g 相当では 34 ヶ月以降、1g 相当では 44 ヶ月以降で延髄で PrP^{Sc} が検出されるようになった [3, 4]。野外発生例では、潜伏期はプリオン汚染の高さ、あるいはプリオンの暴露量に逆比例するので、汚染状況や管理措置の有効性により、BSE 感染牛が延髄で PrP^{Sc} が陽性となり、発症に至るまでの時間は異なる。我が国で実施してきた BSE 検査の結果、21 ヶ月齢及び 23 ヶ月齢で PrP^{Sc} 陽性と判定された 2 例を除くと、死亡牛の BSE サーベイランスで BSE と判定された最も若い牛は 48 ヶ月齢であり、食用に供される牛の BSE 検査で陽性と判定された最も若い牛は 57 ヶ月齢である。これらは共に、飼料規制導入前の 2000 年に生まれた牛である。その後、我が国における飼料規制の遵守度を考慮すると、仮に BSE に感染した牛が発生したとしても、中枢神経系で PrP^{Sc} 陽性となるまでの月齢はさらに延長すると思われる。

一方、新得畜産試験場で実施した BSE の脳内接種により牛は接種 18 ヶ月頃から臨床症状を呈するが、早い例では接種後 10 ヶ月で PrP^{Sc} が検出される。脳内接種という厳しい条件下は、発症前の 8 ヶ月前には PrP^{Sc} が検出可能となること示す結果である [5]。

実験感染牛のプリオンの組織分布の解析から、中枢神経系で PrP^{Sc} が検出されるようになる時期と同時期あるいはそれ以降に、副腎、末梢神経等で PrP^{Sc} および感染性が検出されるようになることから [4]、感染後期には中枢神経系に侵入したプリオンが遠心性に末梢組織に広がると考えられ、特定危険部位 (Specified risk materials, SRM) 以外の組織にもプリオンが存在する。しかし、SRM 以外の組織に存在する PrP^{Sc} の量は中枢神経系と比較して 1/1,000 以下と少ない量である。また、消化管における病原体の分布は、経口投与量により差異はあるものの、早い例では投与後 4 ヶ月かで回腸で PrP^{Sc} が検出される [6]。

BSE 野外発生例でも、副腎、坐骨神経、顔面神経、および半膜様筋などから PrP^{Sc} あるいは感染性が検出されており、SRM 以外にも BSE プリオンが分布する [7, 8]。また、回腸遠位部から PrP^{Sc} が検出され感染性もあることから、BSE 感染後早期から長期間にわたり回腸遠位部では感染性が存在する。特定危険部位に指定されている回腸遠位部よりも上部の消化管でも感染性や PrP^{Sc} が検出される場合があるが、その量は非常に少ない。

4. 欧州及び北米における BSE 対策

英国における BSE の大流行は、斃死獣を処理して肉骨粉を生産するレンダリング工程の変更に起因する。1980-83 年にバッチ法から連続法に変わったが、連続法ではプリオンが完全に不活化されずに肉骨粉に残存した。英国では肉骨粉を代用乳に添加して子牛に与えていたために BSE の感染が拡大した。

英国では BSE の存在が確認されて間もない 1988 年 6 月に、疫学的に肉骨粉が BSE の原因であることをつきとめ、反芻動物由来の肉骨粉を反芻動物に給餌することを禁止した (ruminant feed ban to ruminants)。これが功を奏して、1992-3 年をピークに BSE 摘発数は減少した (図 1)。平均潜伏期が 4-8 年と長いため、効果が現れるまでに時間を要したのである。BSE の発生は減少傾向に転じたが、1988 年の ruminant feed ban が導入された以降に生まれた牛での BSE の発生 (BAB; BSE cases borne after feed ban) があったことから (4 万 5 千頭以上が ruminant feed ban 導入後に生まれた牛)、1994 年には、故意あるいは過失による肉骨粉の牛への給餌を防止するため、動物由来の肉骨粉を反芻動物に使用することを禁止した (animal feed ban to ruminants)。また、1996 年 3 月の vCJD の報告を受け、全ての家畜への動物由来の肉骨粉の使用を禁止した (complete feed ban)。1996 年の complete feed ban の導入以降に生まれた牛から 160 頭の BSE が摘発されている (BARB; BSE cases bone after the reinforced ban)。

英国では、1989 年は、特定危険部位 (当初は SBO [Specific bovine offal] と呼ばれていた) を人の食用に供することを禁止した。また、1995 年には、脊髄や神経節が混入する可能性のある機械的回収肉の使用を禁止した。1996 年の vCJD の発生を受けて、30 ヶ月齢以上の牛を食用に供さずに殺処分する Over thirty months scheme (OTMS) を導入した。その後、BSE 汚染状況が改善されてきたことから、2005 年 11 月以降は、1996 年以前に生まれた牛に対してのみ OTMS を継続し、30 ヶ月齢以上の健康と畜牛の検査の実施を開始した。

EU 諸国では 1994 年、スイスでは、1990 年に飼料規制 (ruminant feed ban) を導入し、2001 年には complete feed ban を導入した。また、特定危険部位の除去も開始した。EU 諸国では 2000~2001 年にかけて、24 あるいは 30 ヶ月齢以上の食用に供される健康と畜牛の BSE 検査を導入した。これにより、BSE の摘発数は急激に上昇した。24 ヶ月齢以上のリスク牛 (死亡牛、切迫と殺牛、臨床牛) の BSE サーベイランスも実施し、これら BSE 検査の実施により、欧州での BSE 発生状況及び汚染状況が正確に把握できた。EU では飼料規制、特定危険部位の除去及び BSE サーベイランスを継続するとともに、欧州委員会 (European commission, EC) は、2005 年及び 2010 年に TSE ロードマップを公表し、BSE 汚染状況の変化と管理措置の実効性を考慮して、向こう 5 年間の管理措置の短・中期的、及び長期的な見直し等の方向性を示してきた。EC は、2009 年 1 月には、健康と畜牛の BSE 検査の対象月齢が 48 ヶ月齢、2011 年 7 月には 72 ヶ月齢に引き上げても良いこととなった。また、2013 年 3 月以降は、一部の加盟国で健康と畜牛の BSE 検査を廃止しても良いとした。各国の特定危険部位の定義は表 2、BSE 検査対象は表 3 に示した。

アメリカ・カナダの BSE 対策、EU 諸国及びわが国とは異なる部分がある。EU 諸国では一時的でも complete feed ban を導入した。一方、アメリカ・カナダでは、1996 年以降、ruminant feed ban を導入したが、牛由来飼料の他種動物への使用は禁止していなかった。飼料規制は BSE の汚染を低下させ、BSE の再興を防ぐ最も重要な管理措置であるが、その遵守度の評価は難しく、最も客観的な方法は、BSE サーベイランスによる BSE 発生状況の把握である。英国における BAB 及び BARB の存在や交差汚染の問題から、飼料規制の強化は BSE 清浄化のために重要と考えられてきた。アメリカでは 2009 年 10 月から、カナダは 2007 年 7 月から、飼料規制が強化されたが、特定危険部位を含まない牛由来飼料は、他種動物への使用を認めている。このように、一口に飼料規制と言っても、その内容は欧州および我が国と北米では異なる。

EU 諸国及びわが国では、リスク牛の BSE サーベイランス、及び食の安全・安心確保のために健康と畜牛の BSE 検査と特定部位の除去が実施されてきた。一方、カナダ・米国、及びスイスはリスク牛の BSE サーベイランスと特定危険部位の除去を実施してきた。BSE の管理措置は国と地域により異なるため、BSE リスクの評価は一律の基準で実施することは出来ず、BSE の発生状況、家畜や飼料の輸入状況、家畜の飼養形態、レンダリング産物の産生様式、飼料規制の実施状況、および管理措置の実効性などから総合的にする必要があった。

5. わが国の BSE 対策の変化

わが国では 2001 年 9 月に BSE の摘発を受け、BSE が食を介して人に伝播することを防止するための緊急措置として、食用に供される牛全頭を対象とした BSE スクリーニング検査 (ELISA による一次検査と WB による確認検査) と特定危険部位の除去を柱とした対策を導入した (2001 年 10 月開始)。この二つの対策は BSE 病原体の人への感染防止を目的とした出口側の管理措置である。世界的には例がない全頭を対象とした検査は、その是非が議論されることとなったが、当時は 1996 年に WHO が唱えた「BSE 感染牛のいかなる組織もフードチェーンにまわしてはならない」との考え方、月齢の正確な確認方法がなかったこと、汚染状況が判らなかつたこと、人に感染すると 100% 致死の治療法のない病気であること、などを考慮すると、予防原則に基づく政治的決断は適切であったと考える。

一方、BSE の牛間での感染拡大防止と BSE 汚染状況の把握のため、法的拘束力を伴う飼料規制 (2001 年 9 月開始) と死亡牛の BSE サーベイランス (2003 年 4 月開始) を導入した。これらは、BSE の清浄化を目指すための入り口側の管理措置である。また、出生・育成履歴を明らかにするためのトレーサビリティ制度も導入した (2003 年 12 月開始)。臨床症状による BSE の診断は難しいことから、BSE の汚染状況の正確な把握には、PrP^{Sc} の検出による能動サーベイランスが必要である。わが国で実施してきた BSE スクリーニング検査と死亡牛の BSE サーベイランスは、2002 年 1 月以降に生まれた牛で BSE に罹患した牛が存在せず、我が国における BSE の汚染度が限りなく低下したことが証明された。

BSE の発生状況と継続的な管理措置の実施から、わが国は 2009 年 5 月には OIE が認定する「管理されたリスク国」となり、2013 年 2 月には「無視できるリスク国」となった。

2001 年 9 月の BSE 発生に伴う BSE 管理措置導入後、食品安全委員会では、BSE 発生状況及び BSE の病態機序に関する科学的知見、及び管理措置の遵守状況などを抛り所に、国内の BSE 対策の見直し、および国境措置の変更に係る健康影響評価を実施してきた。厚生労働省は 2005 年 8 月に、食品安全委員会による「我が国における BSE 対策に係る食品健康影響評価」(2005 年 5 月)を受け、BSE 検査の対象月齢を 21 ヶ月齢以上に変更した (3 年間の経過期間を設けた)。しかし、変更後も、対象となる牛が 10% 強と少ないこと、消費者の BSE に対する根強い不安・不信などから、各自治体は全頭を対象とした BSE 検査を継続した。

この時、20 ヶ月齢以下の牛を検査対象から除外しても、「人の健康に影響を及ぼすリスクの増加は非常に小さい～無視できると」結論するに至ったのは、わが国で実施してきた BSE スクリーニングで 20 ヶ月齢以下の牛で陽性例が見つかっていないこと、英国が BSE に高度に汚染されていた時期では、20 ヶ月齢で BSE と診断された症例があるもの、BSE の平均潜伏期は 4-8 年であること、また、BSE 汚染度の低下とともに BSE と診断される最も若い牛の月齢は高くなること、実験感染牛におけるプリオンの体内分布と蓄積の程度などの科学的知見に加え、2001 年 9 月の飼料規制導入後に生まれた牛が対象となること、SRM の除去や SRM による枝肉の汚染防止措置などのリスク低減措置、飼料規制遵守が担保されること、などを前提とした総合的な判断であった。

2013 年には、「牛海綿状脳症 (BSE) 対策の見直しに係る健康影響評価」(2012 年 10 月 [9] および 2013 年 5 月)を受けて、食用に供される牛の BSE 検査の対象月齢が 30 ヶ月齢以上 (2013 年 4 月施行、実際にこれを実施した自治体はない)、つづいて 48 ヶ月齢以上に引き上げられた (2013 年 7 月施行)。食品安全委員会では、2011 年 12 月に厚生労働省からの諮問を受けて、これらの健康影響評価を開始した。わが国で BSE が確認されてから 10 年以上が経過したが、2002 年 1 月以降に生まれた牛で 10 年間 BSE の発生がなく、飼料規制が遵守されて BSE 清浄化が進んだことは明らかである。加えて世界的にも BSE の発生数は激減しており、BSE リスクが低下している。また、BSE 感染牛におけるプリオンの体内分布とその経時的変化に関する科学的知見も、「我が国における BSE 対策に係る食品健康影響評価」(2005 年 5 月)の時よりも集積している。これらを総合的に判断して、まず、諮問にあった具体的な月齢として、検査対象月齢を 30 ヶ月齢以上に引き上げた場合の人への健康影響を評価し、続いて、

さらなる対象月齢の引き上げについて評価し、検査対象月齢を48ヶ月齢以上に引き上げても、人への健康影響は無視できると判断した。検査対象月齢が48ヶ月齢以上に変更されたことで、対象となると畜牛は全体の15%程度となった。2013年2月には、特定危険部位も管理措置が緩和された。わが国における特定危険部位の変更の概要は表2に示した。

国境措置についても緩和が進んでいる。米国・カナダでのBSEの発生を受けて禁止していた北米産の牛肉の輸入が、2005年12月に、20ヶ月齢以下を条件に解禁された。この管理措置の変更に係る食品健康影響評価に関しては、BSEが政争の具となったような印象を持つ方も多いと思われるが、食品安全委員会では可能限り科学的知見に基づく慎重な議論を行った。当時は米国・カナダともにBSEの汚染状況、飼料規制などの管理措置の遵守状況など不確実な要素が多く、米国・カナダと我が国で産生される牛肉等におけるBSEリスクの科学的な同等性の評価は困難であった。しかし、米国・カナダが提案する日本向け牛肉等の輸出プログラム（SRMは全月齢から除去すること、枝肉格付けあるいは生産記録に基づく月齢証明により20ヶ月齢以下と証明される牛であること）が遵守されることを前提として、「20ヶ月齢以下の米国・カナダの牛に由来する牛肉等と我が国で産生される牛肉等のリスクの差は非常に小さい」と結論するに至った（2005年12月）。

また、2013年2月には、BSE発生国であった、アメリカ、カナダ及びフランス（30ヶ月齢以下）、及びオランダ（12ヶ月齢以下）からの牛肉の輸入が認められた。食品安全委員会では、北米とEU諸国ではBSE管理措置の中でも飼料規制のレベル、トレーサビリティによる月齢確認体制、及びサーベイランスの規模は異なるが、世界的にBSEの発生は激減してリスクが非常に低下していること、BSE感染牛におけるプリオンの体内分布などの科学的知見に加えて、SRM除去などのリスク低減措置の継続実施などを総合的に判断して、「上記4カ国からの30ヶ月齢以下の牛肉の輸入が輸入されても、現状とリスクの差は非常に小さく、人への健康影響は無視できる」と答申するに至った（2012年10月）。

6. 非定型 BSE

健康なと畜牛をも検査する能動的なBSE検査は、新たな懸念を見いだす結果ともなった。元来、世界で発生していたBSEは英国由来であり、同じ病原体がウシや飼料の輸出に伴い世界中に広まったと考えられていた。しかし、能動的サーベイランスは、従来のBSE（定型BSE）とは異なるタイプのBSEである非定型BSEの存在を明らかにした。最初にイタリアで発見されたが、その後、能動的サーベイランスを実施している殆どの国で非定型BSEが発見されるようになった（表4）。

非定型BSEにはL-BSEとH-BSEがある。これは、WBで検出されるPrP^{Sc}の分子量が、定型BSEと比較して小さい（L-BSE）、あるいは大きい（H-BSE）ことに由来する。非定型BSEは8歳以上の高齢の牛で見つかることが殆どである。フランスでの出生コホートの比較では、定型BSEは1996年前後生まれの牛に集中しているのに対し、非定型BSEの出生年から特定の原因を見いだすことはできない[10]。非定型BSEは高齢の牛で散発的に発見されることから、人の孤発性CJDのように特発性BSEである可能性がある。L-BSEは各種動物への伝達試験の成績も明らかになっている。ウシや牛PrPを発現するTgマウスへ接種した場合、定型BSEよりも短い潜伏期で発病する。サルへの感染実験、あるいは人PrPを発現するTgマウスへ接種した場合も、定型BSEよりも短い潜伏期で発病する（図4）。従って、L-BSEは人への感染性を有すると考えられる。仮に、非定型BSEが一定の頻度で自然発生する孤発性BSEだとすると、BSEの根絶は困難である。また、非定型BSEでも、定型BSEと同様に、蓄積量は非常に低いが末梢神経からもPrP^{Sc}が検出される。しかし、高齢牛で発見される、発生頻度が1/10⁷程度と予想される希な疾患である。従って、牛由来飼料の使用規制、一定の年齢以上のウシの特定部位の排除、及び一定の年齢以上のウシのBSEスクリーニング/サーベイランス等の継続により、非定型BSEが新たなBSE発生の原因となる可能性、および人への感染のリスクは十分に排除できると考えられる。

5. おわりに

BSEの存在が明らかになってからもうすぐ30年が経過する。また、わが国でBSEの1例目が確認されてからは12年が経過した。当時の社会的混乱を思い起こすと、短期間で、適切な飼料規制の遵守によりBSEの発生を封じ込めたことは評価すべきである。しかし、非定型BSEの存在や、他の反芻動物へのBSE感染が起こりうる事実を考慮すると、今後も、反芻動物を対象とした飼料規制の徹底及び

適切な BSE サーベイランスの維持・継続は必要である。

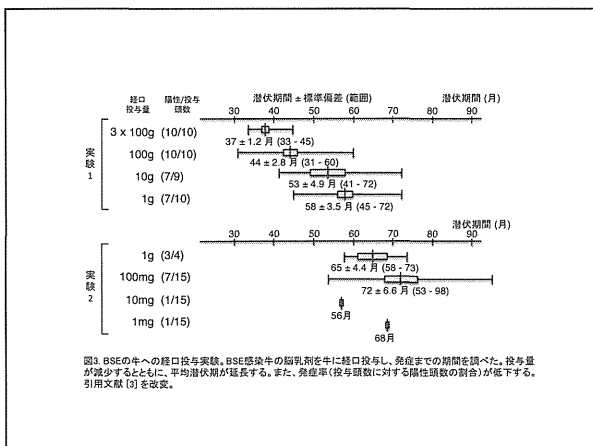
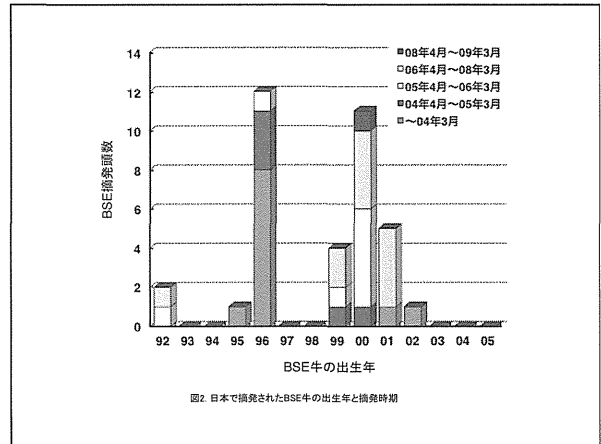
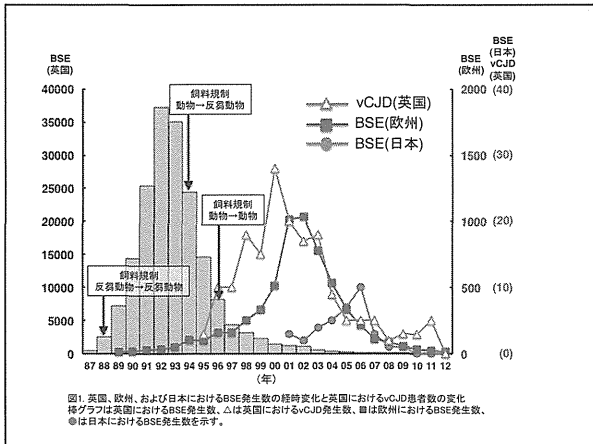
Looking back on the occurrence of BSE and its control measures

Motohiro Horiuchi

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

The emergence of BSE and appearance of vCJD thereafter became worldwide concern. However, implementation of control measures for BSE worked properly and after 2009, total BSE cases in the world became less than 100. BSE is now under the control and in Japan, no BSE cases are found in cattle born after February 2002. The occurrence of BSE provided an opportunity to review food safety measures worldwide. In Japan, Food Safety Basic Act was implemented and novel framework of scientific based risk analysis by food safety committee was established. Although a society's concern on BSE has gone along with its convergence, this review summarizes the occurrence of BSE and BSE control measures.

- [1] European Commission: Update of the opinion on TSE infectivity distribution in ruminant tissue. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out296_en.pdf (2002)
- [2] Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH: Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 88: 1048-1055 (2007)
- [3] Wells GA, Konold T, Arnold ME, Austin AR, Hawkins SA, Stack M, Simmons MM, Lee YH, Gavier-Widén D, Dawson M, Wilesmith JW: Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. *J Gen Virol*, 88: 1363-1373 (2007)
- [4] Masujin K, Matthews D, Wells GA, Mohri S, Yokoyama T: Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. *J Gen Virol*, 88: 1850-1858 (2007)
- [5] Fukuda S, Onoe S, Nikaido S, Fujii K, Kageyama S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Yoshioka M, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T, Okada H: Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Jpn J Infect Dis*, 65: 37-44 (2012)
- [6] Hoffmann C, Eiden M, Kaatz M, Keller M, Ziegler U, Rogers R, Hills B, Balkema-Buschmann A, van Keulen L, Jacobs JG, Groschup MH: BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Vet Res*, 42: 21 (2011)
- [7] Buschmann A, Groschup MH: Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis*, 192: 934-942 (2005)
- [8] Iwamaru Y, Okubo Y, Ikeda T, HHayashi H, Imamura M, Yokoyama T, Shinagawa M: PrPSc distribution of a natural case of bovine spongiform encephalopathy. In: *Prions - Food and Drug Safety* (ed by Kitamoto T), pp179, Springer-Verlag, Tokyo (2005)
- [9] 食品安全委員会：プリオン評価書 牛海綿状脳症(BSE)対策の見直しに係る食品兼好影響評価 2012年10月
- [10] Biacabe AG, Morignat E, Vulin J, Calavas D, Baron TG: Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. *Emerg Infect Dis*, 14: 298-300 (2008)
- [11] Seuberlich T, Heim D, Zurbriggen A: Atypical transmissible spongiform encephalopathies in ruminants: a challenge for disease surveillance and control. *J Vet Diagn Invest*, 22: 823-842 (2010)
- [12] European Food Safety Authority: Scientific and technical assistance on the minimum sample size to test should an annual BSE statistical testing regime be authorized in healthy slaughtered cattle. *EFSA Journal*, 10: 2913 (2012)



感染実験に使用した動物	定型BSE	非定型BSE	
		H型	L型
牛	伝達可能 (脳内接種、経口投与)	伝達可能 (脳内接種) 経口投与は実験結果の報告なし	伝達可能 (脳内接種) 経口投与は実験結果の報告なし
牛PrP発現 トランスジェニックマウス	伝達可能 (脳内接種)	伝達可能 (脳内接種)	伝達可能 (脳内接種)
霊長類(サル)	伝達可能 (脳内接種、経口投与)	感染実験結果の報告なし	伝達可能 (脳内接種、一部経口投与*)
ヒトPrP発現 トランスジェニックマウス	伝達可能 (脳内接種)	伝達例の報告なし	伝達可能 (脳内接種)

*ネズミキツネザルで経口投与により伝達

図4 定型BSE、H型およびL型非定型BSEの異種動物への伝達試験。

表 1. BSE 対策

	英国	欧州	日本
1988年7月	反芻動物由来飼料の反芻動物への使用禁止		
1989年11月	牛(6ヶ月齢以上)の特定臓器(SBO)の人の食用禁止		
1990年11月		牛(6ヶ月齢以上)の特定危険部位の人の食用禁止	
1990年12月		肉骨粉の反芻動物への使用禁止(スイス)	
1994年6月		動物由来飼料の反芻動物への使用禁止(EU)	
1994年11月	動物由来飼料の反芻動物への使用禁止		
1996年3月	vCJDの報告 動物由来飼料の全家畜への使用禁止		反芻動物由来肉骨粉を反芻動物へ使用しないよう行政指導
1996年4月	30ヶ月齢以上の牛を人の食用、動物の飼料から排除するための殺処分を決定(OTMS)		
2000年6月		特定危険部位の除去	
2001年1月		食用に供される健康と畜牛の BSE 検査開始 (24もしくは30ヶ月齢以上) 動物由来飼料の全家畜への使用を暫定的に禁止	
2001年9月			BSEの発生確認 動物由来飼料の反芻動物への使用禁止
2001年10月			食用に供する牛の BSE 検査開始(全頭対象) 牛の特定危険部位の除去・焼却 動物由来飼料の全家畜への使用禁止
2003年4月			死亡牛の BSE サーベイランス開始
2003年7月			食品安全委員会設立
2003年12月			米国からの牛肉の輸入禁止 牛のトレーサビリティ制度開始
2005年8月			食用に供する牛の BSE 検査から 20ヶ月齢以

			下の牛を除外
2005年11月	食用に供される健康と畜牛をEUと同等の規則を適用（1996年以降に生まれた牛）		
2005年12月			米国・カナダの20ヶ月齢以下の牛の牛肉等の輸入再開
2009年1月		食用に供する健康と畜牛のBSE検査対象月齢を48ヶ月齢超に変更可能(EU15)	
2009年5月			OIEのBSEステータス：管理されたリスクに認定
2011年7月		食用に供する健康と畜牛のBSE検査対象月齢を72ヶ月齢超に変更可能(EU25, ブルガリア、ルーマニアを除く)	
2012年10月			BSE対策の見直しに係る食品健康影響評価
2013年2月			米国、カナダ、フランスから30ヶ月齢以下の牛の牛肉等の輸入解禁
2013年3月	食用に供する健康と畜牛の検査を廃止	食用に供する健康と畜牛のBSE検査対象月齢を廃止しても良い（加盟国の一部）	
2013年4月			特定危険部位の変更 食用に供する牛の対象月齢を30ヶ月齢超に変更
2013年5月			OIEのBSEステータス：無視できるリスクに認定
2013年7月			食用に供する牛の対象月齢を48ヶ月齢超に変更

表 2. 各国における牛の特定危険部位

	日本		米国、カナダ	EU	OIE	
	～2013年2月	2013年3月～		フランス、オランダ	管理されたリスク国	無視できるリスク国
頭部（頭蓋骨、眼球を含む）	全月齢の頭部（舌、頬肉を除く）	30ヶ月齢超の頭部（舌、頬肉を除く）	30ヶ月齢超の頭部	12ヶ月齢超の頭部	30ヶ月齢超の頭部	条件なし
扁桃	全月齢	全月齢	全月齢（米国） 30ヶ月齢超（カナダ）	全月齢	全月齢	
脊髄	全月齢	30ヶ月齢超	30ヶ月齢超	12ヶ月齢超	30ヶ月齢超	
脊柱（背根神経節を含む）	全月齢	30ヶ月齢超	30ヶ月齢超	30ヶ月齢超	30ヶ月齢超	
腸	回腸遠位部（全月齢）	回腸遠位部（全月齢）	回腸遠位部（全月齢）	全月例の十二指腸から直腸までの腸管と腸間膜	回腸遠位部（全月齢）	

表 3. 各国における BSE 検査の対象月齢と変遷

	日本	フランス	オランダ	米国・カナダ	OIE
高リスク牛の BSE サーベイランス(組織的な能動的サーベイランスの導入あるいは変更時期)	24 ヶ月齢超の死亡牛 (2003 年 4 月～)	24 ヶ月齢超の高リスク牛 (2000 年 6 月～)	24 ヶ月齢超の高リスク牛 (2000 年～) 48 ヶ月齢超の高リスク牛 (2009 年 1 月～)	30 ヶ月齢超の高リスク牛の一部 (2004 年から拡大サーベイランス)	30 ヶ月齢超の高リスク牛の一部 A 型サーベイランス : 10 万頭に 1 頭の発生率を検出可能 B 型サーベイランス : 5 万頭に 5 万頭の 1 頭の発生率を検出可能
食用に供される牛の BSE 検査(スクリーニング検査の導入あるいは変更時期)	全月齢 (~2013 年 3 月) 30 ヶ月齢超 (2013 年 4 月～) 48 ヶ月齢超 (2013 年 7 月～)	30 ヶ月齢超 (2001 年 1 月～) 24 ヶ月齢超 (2001 年 7 月～) 30 ヶ月齢超 (2004 年 7 月～) 48 ヶ月齢超 (2009 年 1 月～) 72 ヶ月齢超 (2011 年 7 月～)	30 ヶ月齢超 (2001 年～) 48 ヶ月齢超 (2009 年 1 月～) 72 ヶ月齢超 (2011 年 7 月～)	なし	なし
飼料規制後に生まれた牛で最も直近に BSE と診断された牛の生年月	2002 年 1 月	2004 年 4 月	2001 年 2 月	2004 年 8 月 (カナダ)	

表 4. 非定型 BSE の発生状況

国	L 型	H 型	その他	型の情報がないもの	計	BSE 総計
オーストリア	2	1			3	8
デンマーク	1	0			1	16
フランス	13	13			26	1,021
ドイツ	1	1			2	419
アイルランド	0	1		2	3	1,654
イタリア	4	0		1	5	144
オランダ	2	1		1	4	88
ポーランド	8	2		1	11	74
スペイン				1	1	785
スウェーデン	0	1			1	1
スイス	0	1	2		3	467
イギリス	3	3		1	7	184,621
カナダ	1	1			2	20
アメリカ	1	2			3	3
日本	2	0			2	36
	38	28	2	7	74	189,357

引用文献 [9, 11, 12] を統合