

201426034A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

（北海道大学大学院獣医学研究科）

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

（北海道大学大学院獣医学研究科）

平成 26 年度 食品の安全確保推進研究事業
「非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究」
班員名簿

堀内 基広	北海道大学・大学院獣医学研究科・獣医衛生学教室	教授
新 竜一郎	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野	准教授
柴田 宏昭	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	プロジェクト研究員
飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
萩原 健一	国立感染症研究所・細胞生化学部	第 1 室室長
長谷部 理絵	北海道大学・大学院獣医学研究科・獣医衛生学教室	講師
福田 茂夫	北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部畜産工学グループ	研究主任
室井 喜景	帯広畜産大学畜産学部・基礎獣医学研究部門	助教
横山 隆	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所	企画管理部長

目次

I.	総括研究報告書（平成 26 年度）	
	非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究	1
	研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
II.	分担研究報告書	
1.	プリオン感染神経細胞分離法の確立	7
	研究代表者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
2.	非定型 BSE PrP ^{Sc} を検出する RT-QUIC 法の確立	13
	研究分担者 新 竜一郎（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）	
3.	カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価	17
	研究分担者 柴田 宏昭（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）	
4.	非定型 BSE 感染サルの神経病理学的解析	25
	研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）	
5.	霊長類モデルへの伝播による非定型 BSE プリオンの蛋白質化学解析	29
	研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）	
6.	潜在的な非定型 BSE の調査のための RT-Quic 法の立ち上げ	33
	研究分担者 長谷部 理絵（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
7.	非定型 BSE 感染牛における異常型プリオンタンパク質蓄積の経時的解析	39
	研究分担者 福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部）	
8.	非定型 BSE および CWD プリオンの生物学的性状解析	43
	研究分担者 室井喜景（帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門）	
9.	非定型 BSE 感染牛の末梢組織における異常型プリオンタンパク質蓄積の解析	47
	研究分担者 横山 隆（動物衛生研究所・プリオン病研究センター）	
III.	研究成果に関する刊行一覧表	51
IV.	研究成果の刊行物・別刷	53

I. 総括研究報告書

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究
（H 2 6 -食品-一般-0 0 4）

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科

研究要旨

英国で発生して世界各地に広がった BSE（定型 BSE）は大きな社会問題となったが、飼料規制などの管理措置が機能した結果、その発生は制御下にある。しかし、能動サーベイランスの結果、定型 BSE とは性質が異なる BSE（非定型 BSE）が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。本研究では、食品を介する非定型 BSE の感染拡大を防ぐための安全対策等に貢献することを目標として、これまでに培った技術・経験および科学的知見を活用して、1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究、2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究、3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定、に資する研究を進め、平成 26 年度は、以下に述べる研究成果が得られた。

L-BSE 脳内接種牛の臨床症状と PrP^{Sc} 検出時期を調べた結果、臨床症状が出現する 6 ヶ月前には PrP^{Sc} が検出されることを明らかにした。L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織(筋紡錘)に PrP^{Sc} が存在することを明らかにした。また、L-BSE 感染ウシ脳乳剤の希釈液を TgBovPrP に接種し、L-BSE 感染価を測定するための容量-潜伏期標準曲線を作成した。L-BSE 感染ウシの可食部位における感染価測定のため、TgBovPrP への感染実験を開始した。野生型実験動物として、ハムスターが L-BSE および CWD の病態解析に使用できることを明らかにした。プリオン感染動物脳から、プリオン感染神経細胞を同定・分離する方法を世界で初めて確立した。

L-BSE をカニクイザルに脳内接種した場合は、容易に伝達が可能で、sCJD に類似した病理像を示すことから、連続継代によりモデル化を行った。一方、人への感染リスクを評価するうえで重要なカニクイザルを用いた L-BSE の経口接種試験では、接種後 3 年を経過したが、認知機能の変化や臨床症状は認められていない。BSE スクリーニング検査に使用されている市販キットが、L-BSE ウシの摘発に有効であることを確認した。

連続 RT-Quic 法により、高感度かつ高精度に C および L-BSE を識別できるようになった。また、BSE 確認検査陰性検体等を用いて本法の有用性が確認できたことから、次年度、高齢牛を対象に、潜在的な非定型 BSE が存在する可能性を調査する。

研究分担者

新 竜一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野・准教授）

柴田 宏昭（独立行政法人医薬基盤研究所・霊長

類医科学研究センター・プロジェクト研究員）

飛梅 実（国立感染症研究所感染病理部・主任研究官）

萩原 健一（国立感染症研究所細胞生化学部・第 1 室室長）

長谷部 理絵（北海道大学大学院獣医学研究科・講師）

福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場基盤研究部畜産工学グループ・研究主任）

室井 喜景（帯広畜産大学畜産学部基礎獣医学研究部門・助教）

横山 隆（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・プリオン病研究センター・領域長補佐）

A. 研究目的

英国で発生して世界各地に広がった BSE（定型 BSE）は大きな社会問題となったが、飼料規制などの管理措置が機能した結果、その発生は制御下にある。しかし、能動サーベイランスの結果、定型 BSE とは性質が異なる BSE（非定型 BSE）が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。非定型 BSE は自然発生する疾病の可能性があり、実験的に牛やヒト PrP 遺伝子発現マウスに伝達することから、牛を飼養する国と地域の共通の問題として、グローバルなレベルで、感染拡大リスクを考慮した長期的な対策が必要である。しかし、リスク評価および適切な管理措置の策定に必要な科学的知見が乏しいのが現状である。

先の食品の安心・安全確保推進研究事業（平成 20-22 年度、平成 23-25 年度）の実績から、サル、ウシおよび各種モデル動物を用いる感染実験によるプリオン病の病態解析手法、異常型プリオンタンパク質（PrP^{Sc}）の高感度検出法などの技術が格段に向上している。本研究では、食品を介する非定型 BSE の感染拡大を防ぐための安全対策等に貢献することを目標として、これまでに培った技術・経験および科学的知見を活用して、項目 1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究、項目 2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究、項目 3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定、に資する研究を進める。

本研究で取り組む、非定型 BSE 感染牛の中樞神

経系における PrP^{Sc} の出現部位と時期の解析、牛可食部位における感染価の解析（項目 1）、霊長類を用いた非定型 BSE の感染実験（項目 2）、潜在的な非定型 BSE の調査（項目 3）、から得られる成果は、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを考慮した BSE 管理措置の策定に必要な科学的知見であり、食品健康影響評価および食品衛生行政に貢献する。さらに、得られる研究リソースおよび技術は、プリオン病の診断・治療法の開発、プリオンの検出法に応用可能であり、広く保健医療に貢献する。また、非定型 BSE の病態解明は、難解かつ不明な点が多いことが最大の不安要因であるプリオン病に対する、消費者の不安・懸念の払拭にも役立つ。

B. 研究方法

- 1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究
 - L-BSE および H-BSE 脳内接種牛における PrP^{Sc} の脳内出現部位を経時的に解析して、PrP^{Sc} が検出される時期を明らかにする。
 - L-および H-BSE 実験感染牛の発症牛の可食部位に、検出する PrP^{Sc} およびプリオン感染価が存在するか否かを、免疫組織化学およびウシ型 PrP 過剰発現マウス（TgBovPrP）を用いるバイオアッセイにより調べる。
 - L-BSE の病態解析モデル系として、遺伝子組換え動物以外に、野生型動物を用いる病態解析系の確立を目指す。
 - 組織切片上での PrP^{Sc} 特異染色法（食品の安全性確保推進研究事業[平成 23-25 年実施]で確立）を用いて、C-, L-, および H-BSE 感染牛および感染動物の神経病変を詳細に解析して、非定型 BSE の神経病変の特徴を明らかにする。プリオン病の新規病態解析技術として、PrP^{Sc} 特異染色法を応用して、プリオン感染動物の中樞神経系組織からプリオン感染神経細胞を分取する方法を確立する。
- 2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究
 - 先の食品の安全性確保推進研究事業（平成 23-25 年実施）で開始した、L-BSE 経口接種カニクイザル（2 頭）の、臨床経過の観察、運動機能試験、脳波測定による神経機能解析を継続する。L-BSE の実験モデル化のために実施中の

脳内接種連続継代中のサル（3頭）のについても、同様に実施する。

- ・ H-BSE のヒトへのリスクの推定のために、カニクイザルの経口接種試験を新規に開始して（2-4 頭使用予定）、経過観察、血液および脳脊髄液の採取を行う。
- ・ 市販 BSE 検査キットの非定型 BSE の検出精度を精査する。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定

- ・ 先の食品の安全性確保推進研究事業（平成 23-25 年実施）で確立した、RT-QUIC 法による L-BSE の検出法をさらに改良して高精度化し、高齢牛を対象に潜在的な非定型 BSE が存在する可能性を調べる。
- ・ 非定型 BSE 試料の熱処理や化学処理が C-BSE を誘発する可能性を検討する。

（倫理面への配慮）

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコル等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱いは、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明。

1-1) L-BSE 感染牛の病態解析。

L-BSE を脳内接種した牛を接種後 4.7 ヶ月で病理解剖し、中枢神経系組織における PrP^{Sc} の蓄積を調べた結果、中脳、橋および延髄にわずかな PrP^{Sc} の蓄積を確認した。脳内接種による L-BSE 感染牛の臨床症状は接種後 11 ヶ月頃から確認されることから、臨床症状が出現する 6 ヶ月前に PrP^{Sc} が検出されることが示唆された。

1-2) L-および H-BSE 実験感染牛の発症牛の可食部位のプリオン感染価の解析。

L-BSE 感染ウシ脳乳剤の希釈列を TgBovPrP

に接種し、L-BSE 感染価を測定するための容量-潜伏期標準曲線を作成した。L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織(筋紡錘)に PrP^{Sc} が検出されることを見出した。可食部における L-BSE の感染性の有無を高感度に調べることが必要であることから、L-BSE 感染ウシの筋肉における感染価測定のため、TgBovPrP への感染実験を開始した。

1-3) 野生型動物による L-BSE の病態解析モデル系の確立。

CWD をハムスター、モルモット、スナネズミに脳内接種したところ、ハムスターにのみ伝達可能であった。L-BSE もハムスターのみ伝達可能であり、ハムスターが L-BSE の性状および病態解析に使用できることが明らかとなった。

1-4) プリオン病の新規病態解析技術の確立。

プリオン感染マウスから、神経細胞マーカーと PrP^{Sc} の二重染色により、フローサイトメーターを用いて、プリオン感染神経細胞を同定する方法を確立した。この方法は世界で初めての報告であり、セルソーターを用いて、プリオン感染動物の脳組織からプリオンに感染した神経細胞を分離することが可能となった。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定。

2-1) L-BSE 感染サルの病態解析。

L-BSE (非定型 BSE JP/24 佐世保) では初代接種より、短い潜伏期間で発症が認められ、C-BSE に比べて、発症後の神経症状進行は緩徐であった。ほぼ同様の臨床症状ステージで解剖した安楽死後の MRI 画像では C-BSE 接種サルに比べて、L-BSE 接種サルの脳室拡張が顕著で、脳委縮が進行していた。人への感染リスクを評価するうえで必要となる経口接種群においては L-BSE では 3 年を経過し、明らかな臨床症状は認められていない。

PMCA 法の増幅条件を検討し、L-BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} の超高感度検出が可能になった。発症前の L-BSE 脳内接種サルの脳脊髄液、尿や唾液中にも、PrP^{Sc} が検出されることから、PMCA 法を用いて、経口接種サルの体液を経時的に検査することで、感染成立の有無を調べることが可能となった。

2-2) 市販 BSE 検査キットの非定型 BSE の検出精度。

本邦の市販キット 3 点 (TeSeE BSE、フレライザ BSE、ニッピブル BSE) は、L-BSE ウシの摘発に有効であることが確認できた。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定

3-1) RT-Quic 法による L-BSE の検出法の改良

マウス rPrP を基質とした RT-Quic 法は C-BSE、L-BSE ともに効率よく増幅可能である一方、ハムスター rPrP は L-BSE には反応するが C-BSE には殆ど反応しなかった。この性質を用いて、1 回目の RT-Quic 法をマウス rPrP を基質として行い、引き続き 2 回目の RT-Quic 法をマウスおよびハムスター rPrP を基質として用いて行うことで、高感度かつ高精度に C-および L-BSE を識別できるようになった。

3-2) 潜在的な非定型 BSE が存在する可能性

3-1)の方法を用いて、過去の BSE 確認検査で陰性と判断された検体および、北海道大学で健体あるいは病理解剖された牛(BSE 検査陰性)を調べたが、C-BSE、L-BSE ともに陰性と判定できた。来年度は、高齢牛を対象に、潜在的な非定型 BSE が存在する可能性を調査する。

3-3) L-BSE が C-BSE の起源となる可能性。

L-BSE 感染脳乳剤を加熱処理したところ、70℃では白濁した状態を維持していたが、100℃以上で固形分の凝集が見られた。135℃以上では液状部分が透明となり、150℃では黄褐色に変色した。また WB では、70℃から 110℃まで明瞭な PrP^{Sc} のバンドが確認され、分子量およびバンドパターンに変化はなかった。次年度、PrP^{Sc} の増幅性などを解析する。

D. 考察

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明。

今回解析した接種後 4.7 ヶ月の脳内接種 L-BSE 感染牛 2 頭に蓄積する PrP^{Sc} は、脳幹部に局限し、蓄積量もわずかであったため、PrP^{Sc} を検出できる初期段階であったと考えられる。脳内接種による L-BSE 感染牛の臨床症状が接種後 11 ヶ月頃から

確認されることから、臨床症状が出現する約 6 ヶ月前、あるいは病末期の約 11 ヶ月前に PrP^{Sc} を検出できることが示唆された。

L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織 (筋紡錘) における PrP^{Sc} の分布を明らかにした。PrP^{Sc} の蓄積部位が筋紡錘に限られていたが、可食部に PrP^{Sc} が存在したことから、可食部における L-BSE の感染性の有無を調べる必要である。

L-BSE と CWD をハムスターに伝達することができた。野生型実験動物への伝達はこれまでになく、L-BSE、CWD およびスクレイピー株との生物学的性状について直接比較が可能となった。自然感染ルートを考えて場合、末梢から中枢神経系に以降する経路、およびその過程における免疫系細胞の関与などの体内動態の検討を進める予定である。

mAb132 を用いる PrP^{Sc} 特異検出法と、フローサイトメトリーの解析法を工夫することで、プリオン感染動物の脳からプリオンに感染した神経細胞を検出することが可能になった。セルソーターを用いて、プリオン感染神経細胞を分取し、プロテオームやトランスクリプトームを行うことで、プリオンに感染した神経細胞で生じる変化をより特異的に解析することが可能となる。また、mAb 132 のエピトープはほ乳類から鳥類まで保存されていることから、本法はマウスのみならず、多くの動物種に応用可能と考えられる。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究。

臨床症状および病理所見から、C-BSE 接種カニクイザルは v-CJD に、L-BSE では s-CJD に類似することから、感染リスクの評価のみならず、人 CJD 病態解明、治療研究に有用なモデルとなりうる可能性が示唆された。人への感染リスクを評価するうえで必要となる経口接種群においては L-BSE では 3 年を経過したが明らかな臨床症状は認められていない。

なお、P3 動物施設における長期飼育については、動物福祉に配慮した管理 (コングトイの導入、青果給餌、相互にアイコンタクトが可能なアイソレーター配置等) を行うとともに、定期的な行動実験による、人との触れ合いが福祉向上に有効と考える。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定

連続 RT-Quic 法で、C-BSE は rHaPrP では検出されないという、rMoPrP と rHaPrP の反応性の違いを利用することで、RT-QUIC 法による L-BSE と C-BSE の鑑別が可能となった。連続 RT-Quic 法により、L-BSE を C-BSE と間違えて判定することを除外できるため、鑑別精度の向上が達成できた。一方、C-BSE が人に伝達した結果生じた vCJD では C-BSE で見られた RT-Quic 法の種特異的基質依存性は観察されなかった。従来、C-BSE と vCJD は生物学的大体および生化学的に非常類似していると考えられてきたが、この結果、C-BSE と vCJD が全く同じ性質を有する訳ではないことを示唆している。

北海道大学で実施した RT-Quic 法では、L-BSE を seed とした場合、RT-Quic の原法を開発した長崎大学の検出感度よりも 10^2 程度検出感度が低かった。長崎大学では、L-BSE 実験感染牛の脳から調整した脳乳剤を使用しており、北海道大学では日本で摘発された L-BSE (BSE-JP24) の検査材料であった延髄から調整した脳乳剤を使用している。この差を明らかにするために、seed の標準品を用いた、検出感度の精度管理は重要な課題である。

E. 結論

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明。

- ・ 非定型 L 型 BSE 感染牛の臨床症状が確認される約 6 ヶ月前に PrP^{Sc} を検出できることが示唆された。
- ・ L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織(筋紡錘)に PrP^{Sc} が存在することを明らかにした。今後、可食部位の感染価測定を実施する。
- ・ 野生型実験動物として、ハムスターが L-BSE および CWD の病態解析に使用できることを明らかにした。
- ・ プリオン感染動物脳から、プリオン感染神経細胞を同定・分離する方法を世界で初め

て確立した。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究。

- ・ L-BSE を経口接種したカニクイザルは、接種後 3 年を経過したが、認知機能の変化や臨床症状は認められていない。
- ・ BSE スクリーニング検査に使用されている市販キットが、L-BSE ウシの摘発に有効であることを確認した。

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定

- ・ 連続 RT-Quic 法により、高感度かつ高精度に C-および L-BSE を識別できるようにした。また、BSE 確認検査陰性検体等を用いて本法の有用性を確認した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

各研究分担者の報告書を参照

2. 学会発表

各研究分担者の報告書を参照

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

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. プリオン感染神経細胞分離法の確立

研究代表者 堀内 基広 北海道大学大学院・獣医学研究科

研究協力者 山崎 剛士 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

研究要旨

プリオン病における神経変性機構を調べるためには、感染動物の脳組織で生じる現象を、神経組織を構築する細胞を個別に分離して解析する必要がある。なかでも、プリオンが感染した神経細胞における変化の解析は神経変性機構を理解する上で重要である。しかし、技術的な困難さ故、これまで、脳組織からプリオン感染神経細胞を分離する方法の報告はない。本研究では、蛍光抗体法で PrP^{Sc} の特異的染色が可能な抗 PrP 抗体 mAb132 を用いて、フローサイトメトリーにより、プリオン感染神経細胞と非感染細胞を区別する方法について検討した。まず、mAb132 を用いてプロ-サイトメトリーによりプリオン持続感染 N2a 細胞と非感染 N2a 細胞を区別できることを確認した。プリオン感染マウス脳をパパイン処理後、抗 NeuN 抗体、mAb132、および 7-AAD による核染色を行い、核を含まない画分や細胞凝集等をゲーティングにより除去することで、PrP^{Sc} 陽性かつ NeuN 陽性の神経細胞を PrP^{Sc} 陰性の NeuN 陽性細胞と区別できた。この方法を用いることで、セルソーターによりプリオン感染神経細胞を分離することが可能となった。

A. 研究目的

プリオン病における神経変性機構を調べるためには、感染動物の脳組織で生じる現象を、神経組織を構築する細胞を個別に分離して解析する必要がある。これまで、ミクログリアやアストロサイト特異的な細胞分離法は報告されている。しかし、プリオン病における神経変性機構を理解する上で、プリオンが感染した神経細胞における変化の解析は重要である。しかし、技術的な困難さ故、これまで、脳組織からプリオン感染神経細胞を分離する方法の報告はない。プリオン感染動物の脳からプリオン感染神経細胞と非感染神経細胞を分離できれば、トランスクリプトームやプロテオームにより、プリオン感染細胞特異的な解析が可能となり、プリオン病の神経変性機構の解析が著しく進展することが期待される。

我々はこれまでに、抗 PrP 抗体の一つである mAb132 が、プリオン持続感染細胞やプリオン感染動物の脳の凍結切片から特異的に PrP^{Sc} を検出可能であることを報告してきた [1-4]。この方法は、細胞や切片をグアニジンチオシアン酸 (GdnSCN) で前処理する必要があるが、mAb132 は PrP^C と殆ど反応しないことから、PrP^{Sc} の細胞

内局在や組織内局在の解析に威力を発揮してきた。本研究では、プリオン感染動物脳組織からプリオン感染神経細胞を分離するために、mAb132 を用いて、フローサイトメトリーにより、プリオン感染神経細胞を染色する方法について検討し、その方法を確立した。

B. 研究方法

1) マウスおよび細胞

プリオン持続感染 N2a 細胞 (ScN2a-3-22L) と非感染 N2a 細胞 (N2a-3) を使用した。また、Chandler 株あるいは Obihiro 株を接種した ICR マウスを使用した。

2) N2a 細胞からの PrP^{Sc} の検出

N2a-3 および ScN2a-3-22L をコラゲナーゼ処理により細胞をディッシュから剥離・分散後、パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、GdnSCN で処理した。その後、mAb132 および他の抗 PrP 抗体を用いて染色し、フローサイトメーター FACS VERSA (Becton Dickinson) を用いて解析した。

3) マウス脳組織からのプリオン感染神経細胞の検出

マウスをセボフルラン深麻酔下で安楽殺し、灌流を行い、脳を採材した。脳をハサミで細切り、HBSSを入れた15 ml遠心管に移し、4°C、300 × g、2分間遠心した。上清を取り除いた後、Neural Tissue Dissociation Kit (P) (Miltenyi Biotec) を用いて細胞を分離した。100 μl のセルストレイナー (BD Falcon) に細胞懸濁液を通し、残存する組織片を除去した。得られた細胞懸濁液をPFAで固定後、GdnSCN処理した。この細胞懸濁液を抗NeuN抗体、Alexa647標識mAb132で染色した。7-AADを用いて核染色を行い、フローサイトメーターFACS VERSA (Becton Dickinson) を用いて解析した。

7-AADの蛍光シグナルを蛍光値の高さと幅に分解して解析するPulse Shape Analysis (PulSA) [5]により、7-AAD陽性画分をゲーティングし、さらに前方散乱光 (FSC) のシグナルのPulSAにより細胞凝集物にゲートを設定してこれを除去した。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている (実験番号 2014-1-61)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会にて承認された動物実験計画書 (実験番号 11-0062, 11-0063) に従って実施した。

C. 研究結果

1) フローサイトメトリーによる ScN2a-3-22L 細胞からの PrP^{Sc} の検出

mAb132 を用いる PrP^{Sc} 特異染色がフローサイトメトリーに適用可能であるかを調べるために、N2a-3 および ScN2a-3-22L 細胞を mAb132 および他の pan-PrP 抗体 (mAb106, mAb31C6, mAb44B1) で染色した。これらの抗体を用いて間接蛍光抗体法 (IFA) を行った場合と同様である。IFA では mAb106, 31C6 および 44B1 を用いた場合、N2a から PrP^C のシグナルが検出されるが、mAb132 は PrP^C を殆ど検出しない。一方、ScN2a-3-22L を染色した場合、mAb31C6 および mAb44B1 では強いシグナルは検出されるがこれらの抗体は PrP^C を検出するため PrP^{Sc} 特異的とは言えない。一方、mAb132 では mAb31C6 および mAb44B1 よりも蛍光強度は弱い ScN2a-3-22L から PrP が検出され

る。mAb132 は非感染細胞から PrP を検出しないことから、ScN2a-3-22L で検出された PrP のシグナルは PrP^{Sc} 由来と言える (図 1)。

フローサイトメトリーでは、GdnSCN 未処理の細胞では、mAb106, 31C6, 44B1 はプリオン感染、非感染にかかわらず陽性となった。しかし、mAb132 は感染、非感染細胞ともに陰性であった。細胞を GdnSCN 処理した場合、mAb132 は ScN2a-3-22L のみ陽性となった (図 1)。この結果は IFA の結果と一致していることから、mAb132 はフローサイトメトリーでも、細胞内に存在する PrP^{Sc} を検出可能であることが明らかとなった。

2) マウス脳組織からのプリオン感染神経細胞の検出

脳組織から方法の項で記載した方法に従い調整した細胞懸濁液を、抗NeuN抗体、Alexa647標識mAb132、および7-AADで染色した試料を、フローサイトメーターで解析した。FSCと側方散乱光 (SSC) のプロットから、予想通り、大部分が組織片であった (結果は示さず)。そこで、核を含む細胞集団を特定するために、7-AADのシグナルをPulSAにより解析して、7-AAD陽性集団をゲーティングした。さらに、FSCのPulSA解析により、細胞凝集物と考えられる集団を解析対象から除いた (結果は示さず)。これらのゲーティングにより細胞を絞り込み、NeuNとmAb132 (PrP^{Sc}) の染色を解析した結果、非感染マウスの脳からは、NeuN陽性の細胞集団は検出されるがPrP^{Sc}陽性の細胞集団は検出されなかった。一方、Obihiro株あるいはChnadler株感染マウスの脳からは、NeuN陽性かつPrP^{Sc}陽性の細胞集団とNeuN陽性かつPrP^{Sc}陰性の細胞集団の存在が確認できた (図 2)。

D. 考察

mAb132 を用いる PrP^{Sc} の特異検出法は、浮遊状の細胞を用いるフローサイトメトリーにも応用可能であった。非感染 N2a 細胞からは PrP を殆ど検出されないが、プリオン感染 N2a 細胞からは、PrP が陽性となることから、IFA と同様、検出されるシグナルは PrP^{Sc} 由来と考えて良い。

mAb132 を用いる PrP^{Sc} 特異検出法と、フローサイトメトリーの解析法を工夫することで、プリオン感染動物の脳からプリオンに感染した神経細胞を検出することを可能にした。プリオン感染動物の脳から、プリオン感染神経細胞を特異的に染

色分別する方法はこれまで報告がない。今後、セルソーターを用いて、プリオン感染神経細胞を分取し、プロテオームやトランスクリプトームを行うことで、プリオンに感染した神経細胞で生じる変化が解析可能となる。

また、この方法は、神経細胞だけでなく、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに対しても実施可能であったことから（結果は示さず）、プリオン感染に伴い、神経細胞以外の細胞で生じる変化についても、細胞特異的な解析が可能となる。

E. 結論

抗 PrP 抗体 mAb132 を用いて、プリオン感染動物脳からプリオン感染神経細胞を特異的に検出する方法を確立した。セルソーターを使用することにより、プリオン感染神経細胞を分取することが可能となった。

[参考文献]

- 1) Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R., and Horiuchi, M. 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
- 2) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.
- 3) Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrPSc during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology* 450-451C: 324-335, 2014.
- 4) Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 454: 125-130, 2014.
- 5) Ramdzan YM1, Polling S, Chia CP, Ng IH, Ormsby AR, Croft NP, Purcell AW, Bogoyevitch MA, Ng DC, Gleeson PA, and Hatters DM.

Tracking protein aggregation and mislocalization in cells with flow cytometry. *Nat Methods*, 9: 467-470, 2012.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrPSc during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology* 450-451C: 324-335, 2014.
- 2) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, Pentosan polysulfate, chlorpromazine and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLoS One*, 9 (9): e106516, 2014.
- 3) Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 454: 125-130, 2014.
- 4) Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh TT, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y. Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J Vet Med Sci*, 76: 1001-1008, 2014
- 5) 堀内 基広 BSE の発生とその対策を振り返って 日本獣医師会雑誌 67: 345-353, 2014.

2. 学会発表

- 1) Fujiwara A, Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi, M. Analysis of prion infection in primary cortical neurons. Prion2014, Trieste, Italy, May 27-30, 2014.
- 2) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of mechanism for PrPSc-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody

mAb132. Prion2014, Trieste, Italy, May 27-30, 2014.

- 3) Hasebe R, Sakai K, Song C-H, Takahashi Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi, M. Involvement of CD14 in neuropathogenesis of prion diseases. APPS2014, Cheju, Korea, July 6-7, 2014.
- 4) Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi, M. High throughput detection of PrPSc from prion-infected cells without PK-treatment: cell-based ELISA for novel screening method for anti-prion compounds. APPS2014, Cheju, Korea,

July 6-7, 2014.

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

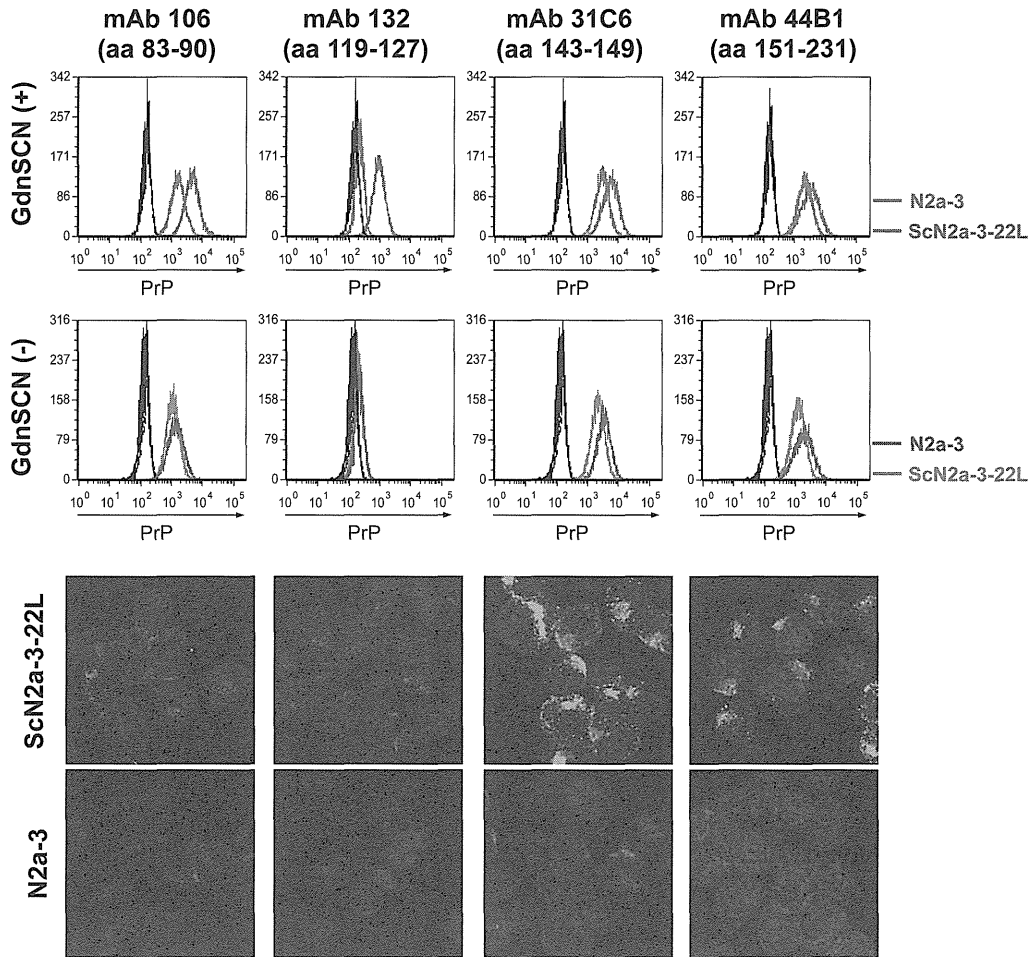


図 1. フローサイトメトリーによる ScN2a-3-22L からの PrP^{Sc} の特異的検出

(上段) フローサイトメトリーによる PrP^{Sc} の特異的検出。使用した抗体は図中に示した。N2a-3 由来の蛍光は青線、ScN2a-3-22L 由来の蛍光は赤線でしめた。また、それぞれの細胞を陰性対照抗体で染色した時の蛍光を黒線および灰色線で示した。上は GdnSCN 処理、下は GdnSCN 未処理の細胞。

(下段) 各々の抗体で ScN2a-3-22L および N2a-3 を染色した時の蛍光抗体染色像。細胞を固定後、GdnSCN 処理をした後、上段に示す抗体で染色した。

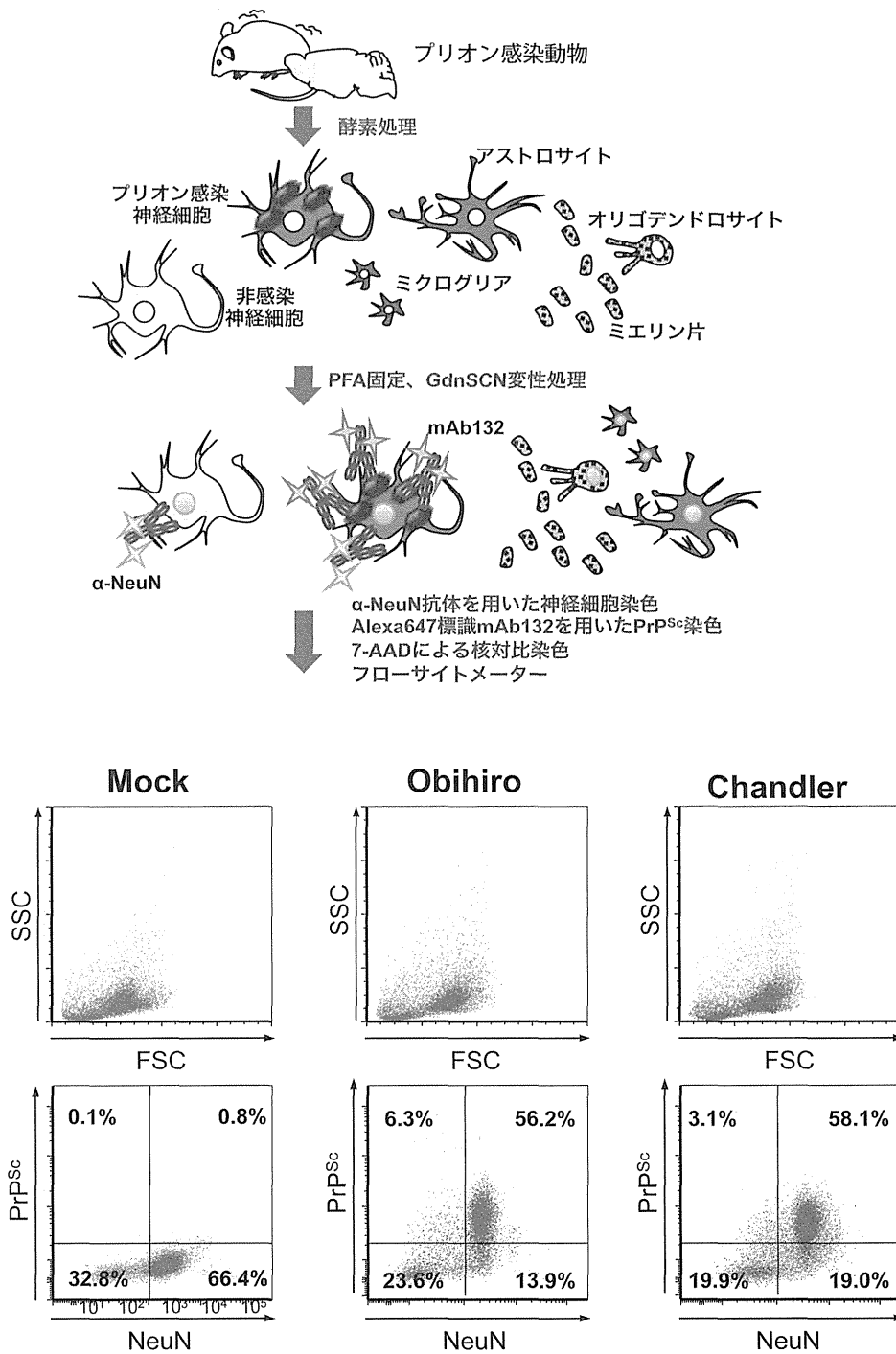


図 2. プリオン感染マウス脳からの PrP^{Sc} 陽性神経細胞の検出

(上段) 試料調整の流れ

(下段) PulSA により、7-AAD 陽性集団をゲーティングし、さらに細胞凝集物と考えられる集団を解析対象から除いた後の前方散乱光と側方散乱光の分散図、および抗 NeuN 抗体と mAb132 (PrP^{Sc}) の二重染色結果を示した。

2. 非定型 BSE PrP^{Sc}を検出する RT-QUIC 法の確立

研究分担者 新 竜一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究協力者 西田教行 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

福田茂夫 (北海道立総合研究機構 畜産試験場)

研究要旨

本研究では異常型プリオンタンパク (PrP) 試験管内増幅法 (RT-QUIC 法: real-time quaking-induced conversion) により非定型 BSE (L-BSE) 感染動物由来の組織・体液に存在する異常型 PrP を微量でも増幅し検出できる高感度検査法を確立することを目指している。これまでの研究により Mouse rPrP (rMoPrP) を基質とした RT-QUIC 法は非定型 BSE (L-BSE)、定型 BSE (C-BSE)、ともに効率よく増幅可能であるが、一方、Hamster rPrP (rHaPrP) は L-BSE には rMoPrP と遜色ないレベルで反応するのに対して C-BSE に対してほとんど反応しないことがわかった。この性質は rMoPrP-RT-QUIC 法で Round2 でも維持されていた。この性質を用いることにより RT-QUIC 法により C-BSE と L-BSE が鑑別可能である。一方、C-BSE からヒトに感染したと想定されている vCJD では上記のような特性は観察されず、sCJD と vCJD の鑑別には使えないことがわかった。このように in vivo と異なるものの、RT-QUIC 法においても PrP 配列やプリオン株が変換反応に大きく関係する場合があることが明らかとなった。

A. 研究目的

非定型 BSE (L-BSE) は定型 BSE (C-BSE) と異なり、孤発性に発生する可能性が考えられるなど、その発症機序やヒトへの感染性のリスクに対する評価が十分に検証されていない。本研究では、我々が開発した異常型プリオンタンパク (PrP) 試験管内増幅法 (RT-QUIC 法: real-time quaking-induced conversion) を用いて、非定型 BSE の高感度検査法を確立し、それを応用した非定型 BSE に対する安全対策の向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP (rPrP) の精製

マウス、ハムスター (23-231&90-231)、ヒト、ウシの PrP 配列の発現ベクターを作製し、大腸菌に形質転換し、発現誘導した。PrP は、金属イオンに結合性を有するため、ヒスチジンタグを導入しなくても金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製可能である。大腸菌に rPrP を発現させると封入体を形成するため、6M のグアニジン塩酸で溶解した後、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) を用いて数時間かけてグアニジン塩酸濃度を 6M から 0M まで徐々に勾配さ

せて rPrP を refold させた後、イミダゾールにより溶出した。透析後、精製した rPrP は小分けして急速凍結し -80°C で保存した。

2) RT-QUIC 法

RT-QUIC 法はテカン社製蛍光プレートリーダー (TECAN Infinite F200) を用いて、30 秒間隔で Shaking と incubation (37°C) を繰り返し 10 分に 1 回蛍光測定を行うプロトコールで行った。Buffer 条件は 500mM NaCl, 25mM PIPES pH7.0, 1mM EDTA, 10 μ M ThT (Thioflavin T) であった。rPrP の濃度は 60-120 μ g/ml の範囲で最適条件を検討した。QUIC 反応のシードとしては L-BSE あるいは C-BSE 感染牛脳乳剤を用い、陰性コントロールとしてシードなし、あるいは非感染牛脳乳剤を添加したものをを用いた。また RT-QUIC 法と end-point dilution の組合せによる L-BSE、C-BSE 脳乳剤中のシード活性の半定量を行った。

3) RT-QUIC 法を応用したプリオン株鑑別検査法の開発

マウス配列 rPrP (rMoPrP) とハムスター配列 rPrP (rHaPrP) に対する L-BSE と C-BSE の RT-QUIC 法における反応の顕著な違いを利用して両者の鑑別法の開発を試みた。

(倫理面への配慮)

L-BSE, C-BSE 感染牛脳乳剤は、国立感染症研究所感染病理部あるいは北海道立畜産試験場基盤研究部より共同研究として提供された。それらは牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し、許可を得たものである。

C. 研究結果

1) L-BSE と C-BSE の RT-QUIC 法における rMoPrP、rHaPrP へのシード活性の顕著な違い

rMoPrP、rHaPrP を反応基質として用い、L-BSE、C-BSE をそれぞれシードとして RT-QUIC 法を行なった (図 1)。その結果、L-BSE は rMoPrP、rHaPrP の両者に対してシード活性を示したのに対して C-BSE は rHaPrP に全く活性を示さなかった。さらに L-BSE、C-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代を継続 (最初の反応を First round とし、その反応液の希釈液の一部を次の反応 (second round) のシードとして RT-QUIC 法を実施) したところ、second round においても rHaPrP は C-BSE 由来の rMoPrP フィブリルに対して反応を示さなかった (図 1)。それに対して L-BSE 由来の rMoPrP フィブリルや rHaPrP フィブリルでは rMoPrP、rHaPrP の両者に高い反応を示した (図 1)。ThT 蛍光値のピーク値も C-BSE をシードにした場合、L-BSE をシードとした場合に対して first round、second round とともに顕著に高い傾向を示した。興味深いことに蛍光顕微鏡上でも C-BSE 由来のフィブリルは L-BSE 由来のフィブリルに比べ、サイズが明らかに大きなものが観察された (未発表データ)。

2) sCJD と vCJD の RT-QUIC 法における rMoPrP、rHaPrP へのシード活性の検討

上記の L-BSE、C-BSE の鑑別法が C-BSE のヒトへの感染が原因と考えられる vCJD と原因不明の孤発性 CJD (sCJD) との鑑別にも応用できるかどうかを検討した。sCJD あるいは vCJD 感染ヒト PrP-Tg マウス脳乳剤の希釈液をシードとし、rMoPrP、rHaPrP を用いた RT-QUIC を second round まで行った (図 3)。rMoPrP は first round において sCJD、vCJD の両者に反応した。rHaPrP も first round においても 1/4 ウェルではあるが、vCJD 脳乳剤に反応し、さらに rMoPrP の first round で生成したフィブリルをシードとした second round の反応においては sCJD 由来と vCJD 由来で QUIC 反応性において差はほとんど見られなかつ

た (図 3)。また C-BSE、L-BSE 間で見られた ThT 蛍光値のピーク値の顕著な違いも sCJD、vCJD 間では観察されなかった。

D. 考察

研究結果で示したような second round まで含めた rMoPrP と rHaPrP の反応性の違いを利用すれば L-BSE と C-BSE の鑑別が RT-QUIC 法によって可能である。すなわち、仮に L-BSE が first round においてたまたま rHaPrP にシード活性を示さず、rMoPrP へのみ陽性だったとしても second round を行うことにより、L-BSE を C-BSE と間違えて判定することを除外できる (図 2)。

一方、vCJD では C-BSE で見られたような RT-QUIC における特性は観察されず、sCJD との鑑別は今回の手法ではできないことが判明した。vCJD は C-BSE がヒトに感染したものと考えられおり、異常型 PrP や病理像において、その特徴も似ていることが知られているが、ヒトで増幅される過程で rHaPrP の C-BSE に対するフィブリル形成反応の抵抗性は失われることが明らかとなった。この分子学的機構の詳細については今後の解析が必要である。

E. 結論

今回の研究により RT-QUIC 法によって L-BSE と C-BSE の鑑別が可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akasaka K, Maeno A, Murayama T, Tachibana H, Fujita Y, Yamanaka H, Nishida N, Atarashi R. Pressure-assisted dissociation and degradation of "proteinase K-resistant" fibrils prepared by seeding with scrapie-infected hamster prion protein. *Prion* 8(3): 314-318. 2014
- 2) Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep* 4:6006, 2014
- 3) Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant

prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol* 88(20), 11791-801, 2014

- 4) Qina T, Sanjo N, Hizume M, Higuma M, Tomita M, Atarashi R, Satoh K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kobayashi A, Kitamoto T, Murayama S, Murai H, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open* 4(5):e004968, 2014
- 5) Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep* 4:4504, 2014

2.学会発表

- 1) Atarashi R. Clinical usefulness of the in vitro amplification of prion amyloid formation. *JSPS*

Japan Hungary Joint Seminar (Nov, 17-21, 2014, Osaka, Japan)

- 2) Sano K, Atarashi R, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *Prion2014* (May, 27-30, 2014, Trieste, Italy)

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