

central nervous system. These observations have led to serious concerns that the disease could spread in humans via blood transfusions (Wroe *et al.*, 2006; Knight, 2010) and through the use of contaminated biological and surgical instruments. In order to effectively prevent the spread of this disease, it is important to be able to detect PrP^{Sc} as soon after infection as possible, and then, it is crucial to avoid PrP^{Sc} contamination in human-derived materials. As the concentration of PrP^{Sc} in the tissues or body fluids of infected subjects is predicted to be extremely low until marked clinical signs appear, development of both a sensitive method for detecting PrP^{Sc} and animal models to confirm its validity are necessary.

Several studies have used non-human primates to study the transmissibility of human prion diseases (Gajdusek *et al.*, 1966; Gibbs *et al.*, 1968), and the transmissibility of BSE has specifically been investigated using macaque monkeys (Lasmézas *et al.*, 1996, 2005; Comoy *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2011a, b). These studies have reported a number of advantages of using non-human primate models of prion disease. For example, the pathological feature of florid plaques in the brain tissue of BSE-infected macaques and the biochemical characteristics of the PrP^{Sc} glycoform profile in these macaques have been shown to be identical to those in human subjects with vCJD (Lasmézas *et al.*, 1996). In macaques inoculated with the BSE prion either intracerebrally or orally and in humans infected with vCJD, PrP^{Sc} has been found to be distributed in various peripheral tissues, such as the lymph nodes, spleen, tonsils and muscles. These findings strongly support the possibility that vCJD is caused by an exogenous infection of a BSE prion. Furthermore, BSE can be transmitted via intravenous inoculation (Lasmézas *et al.*, 2001), indicating that macaques can serve as model animals for suspected cases of secondary transmission (via blood transfusion) of vCJD in humans. Therefore, non-human primate models are ideally suited for assessing methods for diagnosis and treatment of prion diseases.

In scrapie-infected rodents (Brown *et al.*, 1998) and sheep (Houston *et al.*, 2008) as well as in deer with chronic wasting disease (CWD), bodily fluids such as the blood, urine, saliva and faeces have been reported to be infectious (Mathiason *et al.*, 2006; Haley *et al.*, 2009b; Mathiason *et al.*, 2010). By using the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) technique, which amplifies PrP^{Sc} *in vitro* using normal brain homogenates as the PrP^C substrate, PrP^{Sc} has been detected in a variety of bodily fluids, including the blood, cerebrospinal fluid (CSF), urine, faeces, saliva and milk of prion-infected animals (Saborio *et al.*, 2001; Saá *et al.*, 2006; Murayama *et al.*, 2007, 2010; Thorne & Terry, 2008; Terry *et al.*, 2009; Maddison *et al.*, 2009, 2010; Haley *et al.*, 2009a, 2011; Tattum *et al.*, 2010; Gough *et al.*, 2012). Furthermore, several reports have described the successful detection of PrP^{Sc} in bodily fluids of humans with CJD (Orrú *et al.*, 2009; Atarashi *et al.*, 2011; Edgeworth *et al.*, 2011; Peden *et al.*, 2012; Rubenstein & Chang, 2013). For example, PrP^{Sc} in the CSF of patients with sporadic CJD (sCJD) and vCJD has been detected using the

quaking-induced conversion technique (Atarashi *et al.*, 2007), which detects PrP^{Sc}-triggered formation of amyloid fibrils of recombinant prion proteins. Similarly, PrP^{Sc} has been detected in the CSF of patients with sCJD using PMCA followed by a sensitive immunoassay termed SOFIA (Rubenstein & Chang, 2013), and bead-captured ELISA has been used to detect blood PrP^{Sc} in patients with vCJD (Edgeworth *et al.*, 2011). Therefore, bodily fluids may have high utility as diagnostic materials for CJD. However, the quantitative changes of PrP^{Sc} in bodily fluids of non-human primate models of CJD has not yet been determined due to a lack of sensitive methods for assessing very small amounts of prions in these animal models.

In the present study, we have developed a highly efficient PMCA method suitable for cynomolgus macaque BSE PrP^{Sc} amplification. This method, which involves amplifying PrP^{Sc} using xenogeneic (mouse) PrP^C substrate in the presence of sulfated dextran compounds, is capable of amplifying a very small amount of PrP^{Sc} from the CSF, blood, and peripheral tissue of BSE-infected macaques. We further investigated CSF and blood PrP^{Sc} levels during the period from the latent to terminal stages of the disease and compared PrP^{Sc} dynamics in macaques.

RESULTS

Amplification of cynomolgus macaque BSE PrP^{Sc} by PMCA

We first examined the amplification efficiency of PMCA, using the brain homogenate of BSE-infected cynomolgus macaque no. 7 as the PrP^{Sc} seed. Before amplification, distinct signals of protease-resistant PrP (PrP^{res}) were detected in brain homogenates diluted up to 10⁻² by Western blot analysis (Fig. 1a). In the absence of potassium dextran sulfate (DSP), brain homogenates derived from the squirrel monkey and cynomolgus macaque were not suitable for amplification of cynomolgus PrP^{Sc} (Fig. 1b, upper panel). Similarly, no significant amplification was observed using cow, TgBoPrP and PrP^{0/0} mice (Fig. 1b, middle panel), or hamster brain homogenates (Fig. 1b, lower panel) as PrP^C substrates. On the other hand, amplification of PrP^{Sc} was achieved in samples diluted to 10⁻³ and 10⁻⁴ when the WT mouse brain homogenate was used as the PrP^C substrate (Fig. 1b, lower panel). Furthermore, amplification efficiency of mouse PrP^{Sc} for PMCA was significantly improved in the presence of DSP, and PrP^{res} signals were detected in samples diluted to 10⁻⁵ after one round of amplification. On the other hand, DSP was less effective in increasing signal intensity of PrP^{res} after amplifications derived using squirrel monkey, cynomolgus macaque, cow, TgBoPrP mouse and hamster brain homogenates. The detection sensitivity for cynomolgus PrP^{Sc} for these PCMA was lower than for PCMA conducted using WT mouse brain homogenate. Higher background signal in the no-seed samples was observed after amplification was conducted using macaque brain homogenate in the presence of DSP.

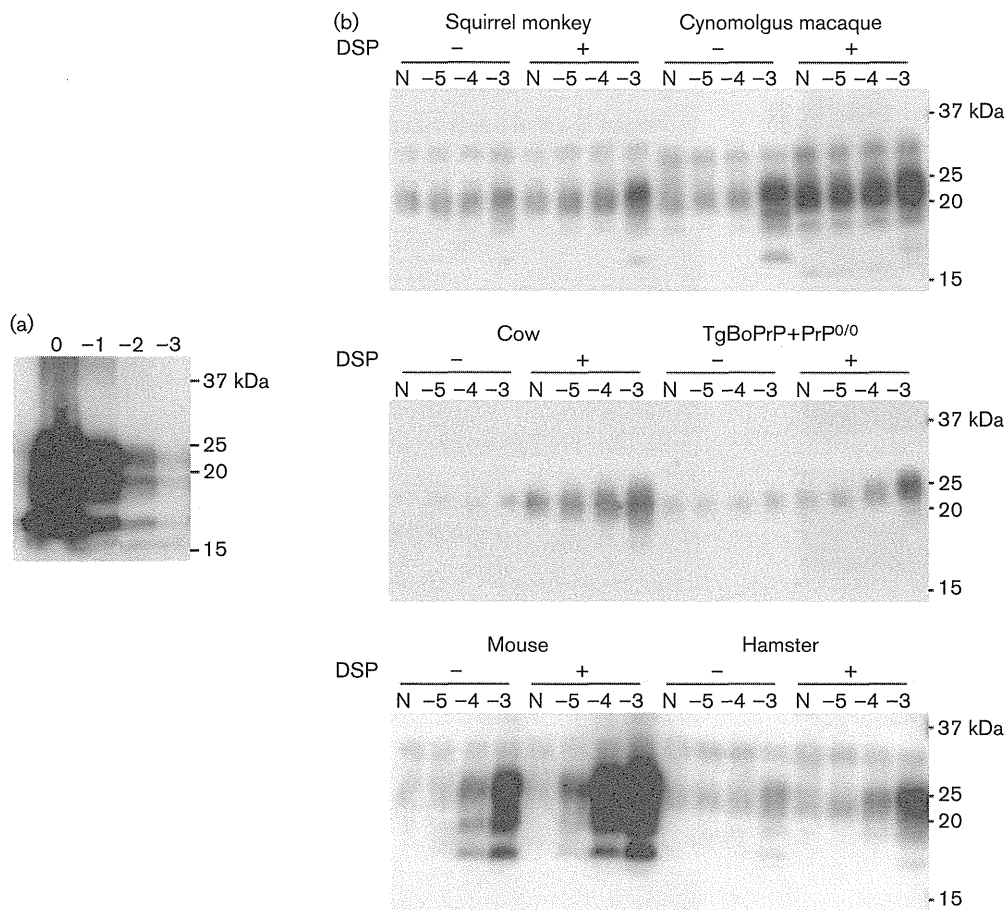


Fig. 1. Amplification of macaque PrP^{Sc} using normal brain homogenates derived from several animal species as PrP^C substrates. (a) Ten per cent brain homogenate of BSE-affected cynomolgus macaque was diluted to 10^{-1} (-1) to 10^{-3} (-3) in a normal macaque brain homogenate, an undiluted sample (0) was also included. The diluted samples were analysed by Western blot after digestion with proteinase K (PK). (b) PrP^{Sc} seed (10% brain homogenate of BSE-affected cynomolgus macaque) was diluted to 10^{-3} (-3) to 10^{-5} (-5) in normal brain homogenates obtained from the squirrel monkey, cynomolgus macaque, cow, mixture of TgBoPrP and PrP^{0/0} (TgBoPrP+PrP^{0/0}) mice, mouse and hamster. The diluted samples were amplified in the presence (+) or absence (-) of 1% (w/v) DSP. After amplification, the samples were digested with PK and analysed by Western blot. 'N' denotes unseeded control samples in which normal brain homogenate that did not receive a PrP^{Sc} seed were processed and analysed in the same manner as PrP^{Sc}-seeded samples. The molecular masses of marker proteins are indicated (kDa).

Detection sensitivity of cynomolgus macaque BSE PrP^{Sc}

PMCA using WT mouse brain homogenate containing DSP as the PrP^C substrate was used for amplification of cynomolgus macaque PrP^{Sc}. On the basis of our preliminary experiments, the optimal concentration of DSP was estimated to be 1% (w/v); therefore, we used 1% (w/v) DSP for subsequent experiments. We determined the detection limit of the interspecies PMCA technique and confirmed that PrP^{Sc} present in a 10^{-5} dilution of infected brain homogenate could be detected after one round of amplification, and both 10^{-6} and 10^{-7} dilutions were positive for PrP^{Sc} after two rounds of amplification (Fig. 2a). After three rounds of amplification, PrP^{res} signals were

detected in the samples diluted to 10^{-8} and 10^{-9} . A PrP^{res} signal was detected in the 10^{-10} dilution samples after four rounds of amplification, but almost no signal was detected in the more extreme dilutions, even after seven rounds of amplification. Thus, compared with no amplification, amplification improved the PrP^{Sc} detection sensitivity by a factor of 10^8 . No typical PrP^{res} signal was detected in samples that contained normal brain homogenate diluted 1:10 with mouse PrP^C substrate (Fig. 2b). In addition, the generation of spontaneous PrP^{res}, as has been reported for amplification in the presence of polyanions (Deleault *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010), was not observed in 16 samples that contained only mouse PrP^C substrate following seven rounds of amplification (Fig. 2c).

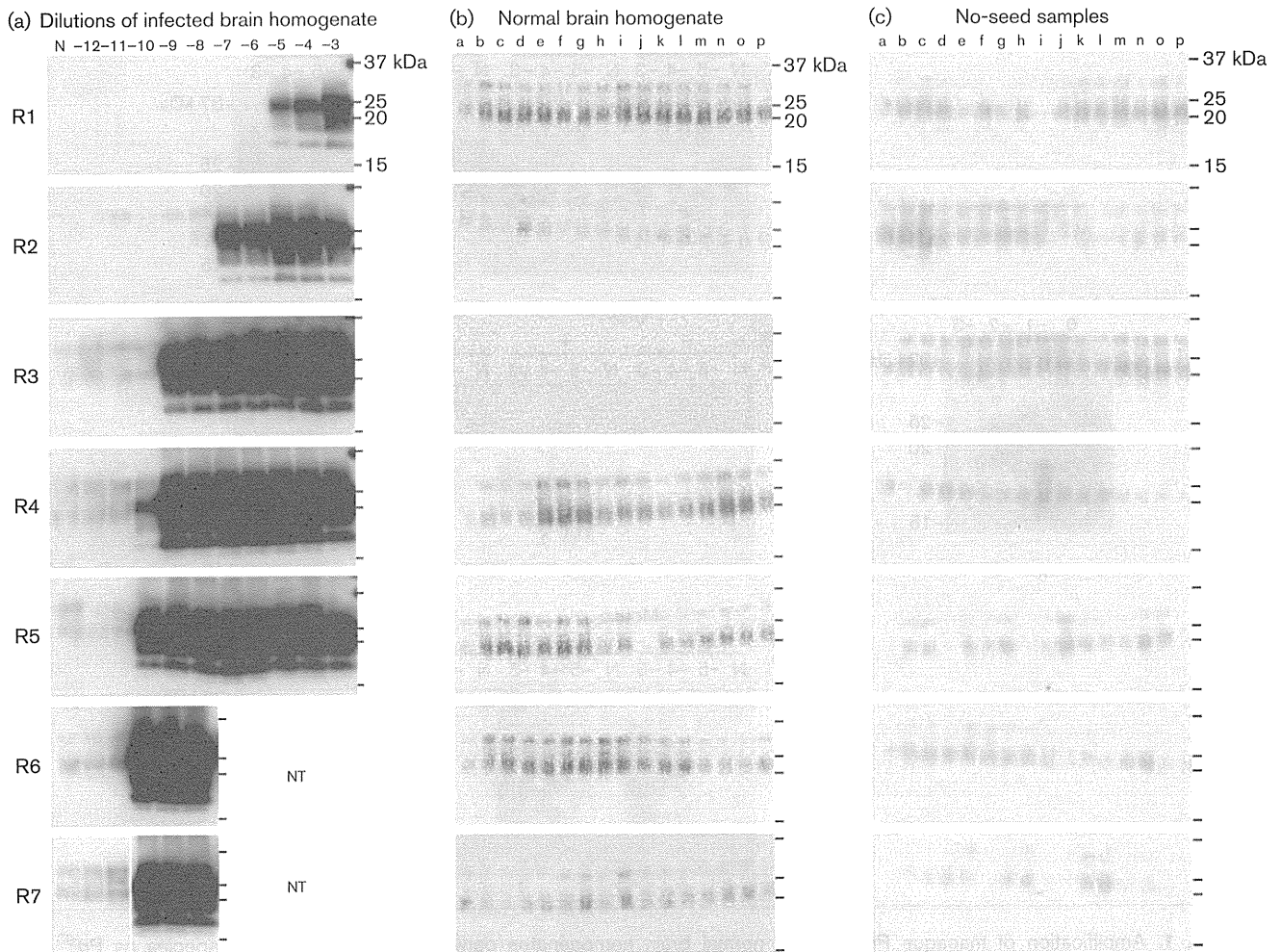


Fig. 2. Detection sensitivity for cynomolgus macaque PrP^{Sc}. (a) PrP^{Sc} seed was diluted to 10^{-3} (-3) to 10^{-12} (-12) with PrP^C substrate (10% normal mouse brain homogenate), and the samples were serially amplified in the presence of 1% (w/v) DSP. The amplified samples were analysed after each round of amplification (R1–R7) by Western blot after proteinase K (PK) digestion. (b) Normal brain homogenate was diluted to 10^{-1} with the PrP^C substrate (lanes a–p), and the samples were serially amplified in the presence of 1% (w/v) DSP. After amplification, a band with a molecular mass similar to that for PrP^{Sc} was occasionally observed, which likely corresponds to a residue of the normal isoform of prion protein resulting from incomplete PK digestion. (c) No spontaneous generation of PrP^{Sc} was observed in no-seed samples. Lanes a–p contained only PrP^C substrate and were amplified in the presence of 1% (w/v) DSP. Exclusive pipettes, a vortex mixer, and a centrifuge were used for handling unseeded samples. The molecular masses of marker proteins are indicated (kDa). NT, Not tested.

PrP^{Sc} distribution in the peripheral tissues of BSE-affected macaques

We examined PrP^{Sc} distribution in macaques that were intracerebrally administered a brain homogenate prepared from a BSE-infected cow. In BSE-infected macaques, PrP^{Sc} was detected by conventional Western blot analysis in several peripheral nervous tissues and lymph nodes (Table S1, available in the online Supplementary Material). By using serial PMCA, PrP^{Sc} was detected in all examined tissues, including: the peripheral nerves, lymph nodes, spleens, tonsils and adrenal glands (Fig. 3). Most samples were found to be positive for PrP^{Sc} after no more than two

rounds of amplification. On the other hand, PrP^{Sc} was detected after three rounds of amplification in four and two of the quadruplicate samples of the tonsil of macaque no. 10 (Fig. 3b) and spleen of macaque no. 11 (Fig. 3c), respectively. No typical PrP^{res} signal was detected in the peripheral nerves, lymph nodes, ileum and glands of an uninfected control macaque (Fig. S1).

PrP^{Sc} levels in the CSF

The amplification results for the CSF samples collected from the three macaques are illustrated in Fig. 4. No typical PrP^{res} signal was observed in samples that contained only

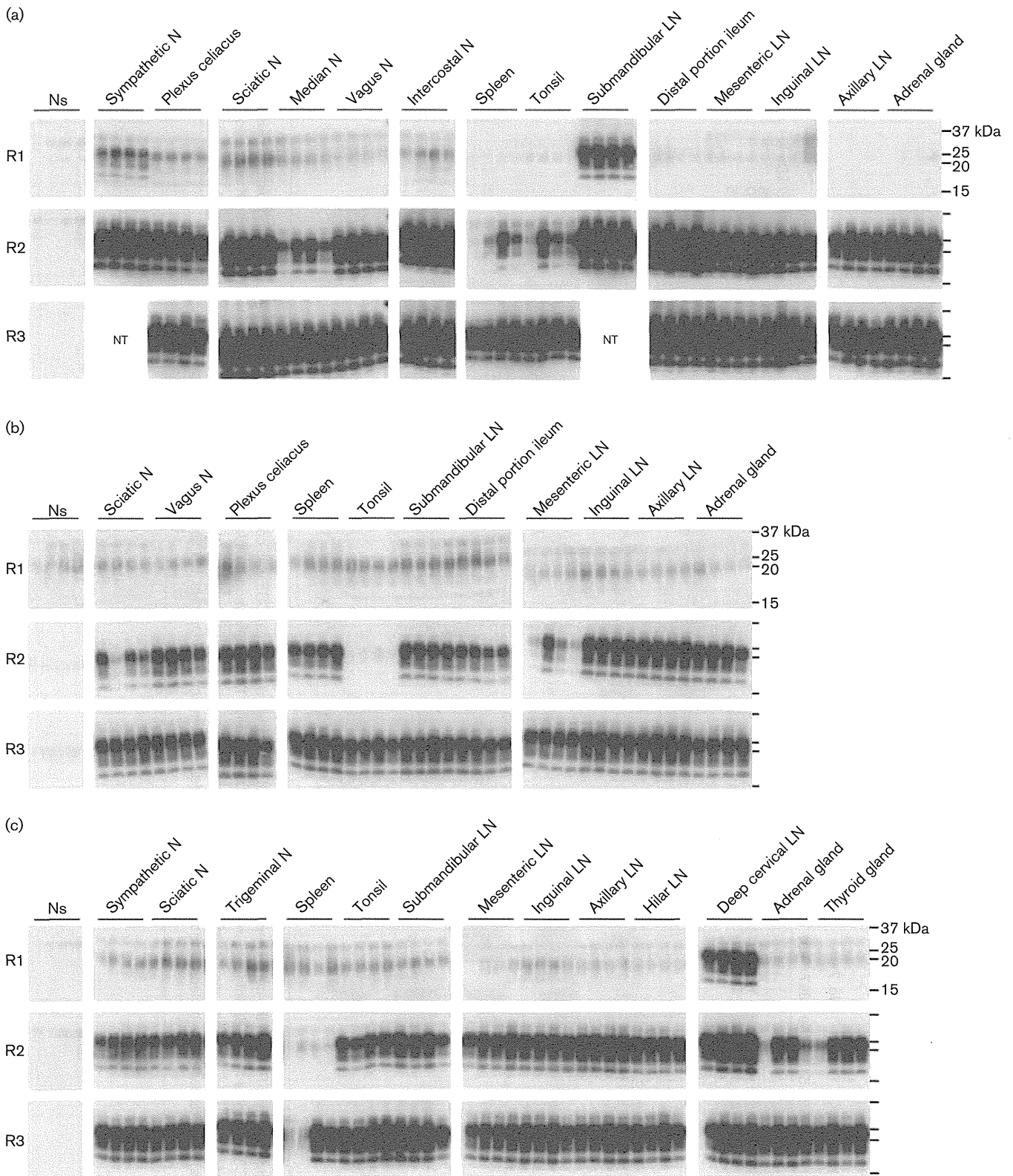


Fig. 3. Tissue distribution of PrP^{Sc} in macaques intracerebrally inoculated with BSE. Tissue distribution of PrP^{Sc} in the terminal disease stage in macaque no. 7 (a), no. 10 (b) and no. 11 (c). Quadruplicate samples of each tissue were serially amplified, and the samples were analysed by Western blot following digestion with proteinase K after each round of amplification (R1–R3). The molecular masses of marker proteins are indicated (kDa). N, Nerve; LN, lymph node; Ns, no-seed samples; NT, not tested.

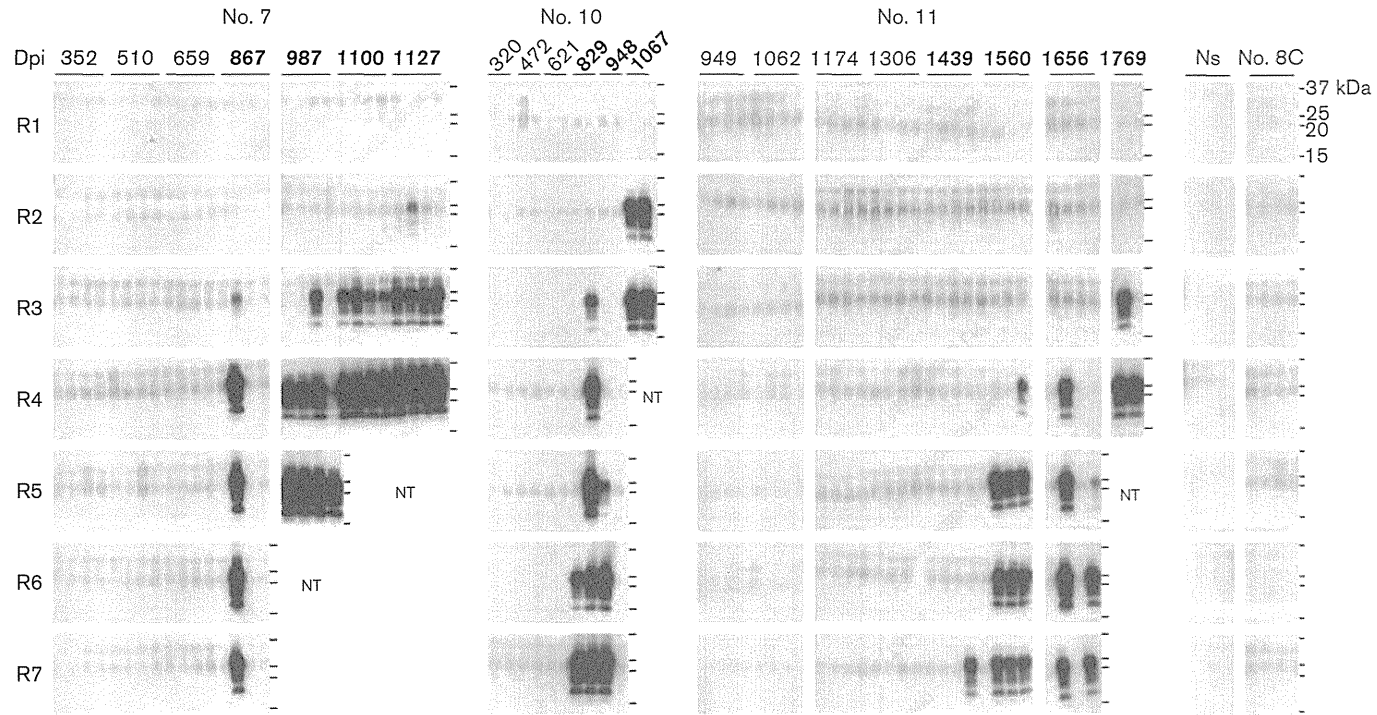


Fig. 4. The appearance of PrP^{Sc} in the cerebrospinal fluid (CSF) of BSE-infected macaques. CSF was collected at several points after intracerebral inoculation. Quadruplicate or duplicate CSF samples from BSE-infected macaque no. 7, no. 10, and no. 11 were analysed by Western blot following digestion with proteinase K after each round of amplification (R1–R7). PrP^{Sc} was also evaluated in CSF samples from an uninfected control macaque (no. 8C). Dpi, Days post-inoculation. Dpi written in boldface represents clinical stages of the disease. The molecular masses of marker proteins are indicated (kDa). Ns, No-seed samples; NT, not tested.

mouse PrP^C substrate (lanes Ns), or samples that contained normal macaque CSF diluted 1:10 with mouse PrP^C substrate (Fig. 4, no. 8C and Fig. S2). PrP^{res} signal was not detected in the samples collected 515–208 (macaque no. 7), 509–208 (macaque no. 10) and 490–133 days (macaque no. 11) before disease onset. The existence of PrP^{Sc} in the CSF samples was confirmed after the onset of clinical signs. For example, macaque no. 7 presented with early neurological clinical signs of the disease such as slight tremor, startle response and festinating gait. PrP^{res} signal was detected after four rounds of amplification in one of the quadruplicate samples collected at this time [867 days post-inoculation (p.i.)], but no other sample was positive for PrP^{Sc} even after seven rounds of amplification. Consistent with disease progression, macaque no. 7 presented with ataxia, paralysis of the extremities and rigidity; PrP^{Sc} was detected in all of the quadruplicate samples obtained at 987 days p.i. after five rounds of amplification. The macaque finally developed severe dysstasia, and after three rounds of amplification, PrP^{Sc} was detected in all of the quadruplicate samples obtained at 1100 days p.i. and at the dissection (1127 days p.i.). These observations suggested that the level of PrP^{Sc} tended to increase in the CSF as the disease progressed. Although a similar tendency was observed in other macaques, there were differences in the levels of PrP^{Sc} in the CSF. For example, duplicate CSF samples collected upon dissection (1067 days p.i.) became positive for PrP^{Sc} after two rounds of amplification in macaque no. 10, which showed the shortest latent period of 828 days. On the other hand, the disease developed after a relatively longer latent period of over 1400 days in macaque no. 11, and PrP^{res} signals were detected after four rounds of amplification in both samples collected upon dissection (1769 days p.i.).

PrP^{Sc} levels in the blood

The results of the amplification of white blood cell (WBC) samples collected at several time points after intracerebral administration are illustrated in Fig. 5. No typical PrP^{res} signal was observed in samples that contained only mouse PrP^C substrate (Fig. 5, lanes Ns), or samples that contained normal macaque WBCs (10⁴ cells) (Fig. 5, no. 8C and Fig. S2). Furthermore, we confirmed that the WBC matrix had no inhibitory effect on the amplification of PrP^{Sc} by serial PMCA (Fig. S3). In macaque no. 7, one of the quadruplicate samples collected upon dissection (1127 days p.i.) became positive for PrP^{Sc} after five rounds of amplification. Similarly, PrP^{res} signal was detected in one or both of the duplicate samples of macaque no. 11 collected at 1656 days p.i., and at dissection (1769 days p.i.). However, PrP^{Sc} was not detected in the blood of these macaques between the latent and the initial stage of disease onset. In macaque no. 10, PrP^{res} signal was not detected in the WBCs obtained during the experimental period (320–1067 days p.i.) even after seven rounds of amplification. With regard to plasma samples, no PrP^{Sc} was detected in any of the samples collected during the experimental period (data not shown).

Infectivity of the PMCA product

The PMCA product obtained after ten rounds of amplification was diluted 10-fold and inoculated intracerebrally into tga20 mice. The tga20 mice inoculated with the PMCA products derived from the brain or WBC PrP^{Sc} seeds died after an average period of 305 or 310 days, respectively (Table 1). PrP^{Sc} accumulation in the brains of mice was confirmed by Western blot analysis (data not shown). There was no significant difference between the survival periods of these PMCA product-inoculated mice (*t*-test, *P*>0.05). Control mice administered with the product containing only PrP^C substrate survived more than 478 days. These results indicated that both brain- and WBC-derived PrP^{Sc} had seeding activities following the PMCA reactions, and the amplified PrP^{Sc} maintained their infectious ability during *in vitro* xenogeneic amplification.

DISCUSSION

In the current study, we developed an ultra-efficient PMCA technique for amplifying PrP^{Sc} derived from BSE-infected cynomolgus macaques by using mouse brain homogenates with DSP as a PrP^C substrate and a polyanion additive, respectively. We first proved the existence of PrP^{Sc} in the CSF and blood of BSE-infected macaques by PMCA, and showed that cynomolgus macaque BSE PrP^{Sc}, and non-macaque PrP^C, effectively converted mouse PrP^C to a proteinase K (PK)-resistant form. It is well known that PMCA of several xenogeneic combinations of PrP^{Sc} seed and PrP^C substrate can overcome the species barrier (Kurt *et al.*, 2007, 2011; Green *et al.*, 2008; Castilla *et al.*, 2008; Yoshioka *et al.*, 2011; Murayama *et al.*, 2012; Nemecek *et al.*, 2013), despite the divergent amino acid sequence of prion proteins. Since the BSE prion was transmissible to ICR (WT) mice (Masujin *et al.*, 2008), the cynomolgus macaque PrP^{Sc} generated by the cross-species transmission of BSE prion may retain the original characteristics of BSE PrP^{Sc}, including structural compatibility with mouse PrP^C and DSP dependency in PMCA reactions.

PrP^{Sc} is detectable in the tonsil, spleen and lymph nodes in vCJD (Wadsworth *et al.*, 2001) and sCJD patients (Rubenstein & Chang, 2013). In an earlier study, PrP^{Sc} was found in the lymphoid tissues, including: the lymph nodes, spleens and tonsils of macaques intracerebrally inoculated with BSE PrP^{Sc} (Lasmézas *et al.*, 1996), as observed in vCJD-inoculated macaques (Lasmézas *et al.*, 2001). Therefore, once PrP^{Sc} accumulates in the brain, it may spread centrifugally from the brain to the peripheral tissues through the autonomic nervous system. However, in our previous study, we failed to detect PrP^{Sc} in such lymphoid tissues of the BSE-inoculated macaques by conventional Western blotting, except in the submandibular lymph nodes, deep cervical lymph nodes and inguinal lymph nodes (Ono *et al.*, 2011a; Table S1). In the current study, PMCA analysis revealed that PrP^{Sc} was distributed in all lymphoid tissues examined in the BSE-infected macaques.

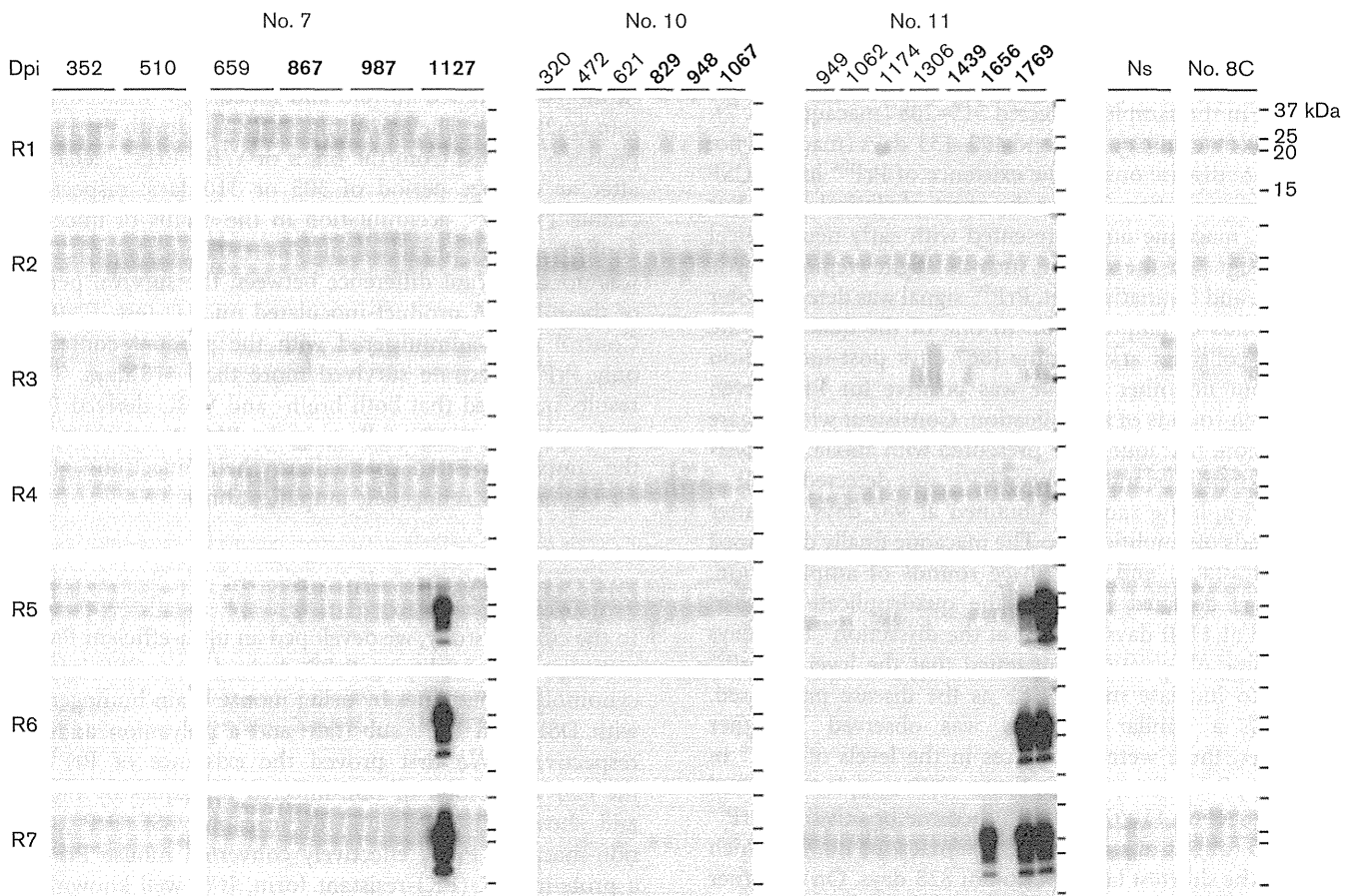


Fig. 5. Appearance of PrP^{Sc} in the WBCs of BSE-infected macaques. WBCs were collected at several points after intracerebral inoculation. Quadruplicate or duplicate WBC samples from BSE-infected macaque no. 7, no. 10 and no. 11 were analysed by Western blot following digestion with proteinase K after each round of amplification (R1–R7). PrP^{Sc} was also evaluated in WBCs from an uninfected control macaque (no. 8C). Dpi, Days post-inoculation. Dpi written in boldface represents the clinical stages of the disease. The molecular masses of marker proteins are indicated (kDa). Ns, No-seed samples.

PrP^{Sc} levels in most of the lymphoid tissues were extremely low, because PrP^{Sc} could only be detected after two or three rounds of amplification. Therefore, significant PrP^{Sc} accumulation in the peripheral non-neuronal tissues might

not have occurred in these macaques, and PrP^{Sc} levels in most lymphoid tissues might have been below the detection limit of the conventional Western blot technique used herein, even at the terminal stage of the disease.

Table 1. Mean incubation time following intracerebral inoculation in tga20 transgenic mice

| Inoculum (R10 PMCA product) | Transmission rate (total death/total number) | Mean survival time \pm SD (days) |
|--|--|------------------------------------|
| Brain seed* | 100 % (6/6) | 305 \pm 10 |
| WBCs seed† | 100 % (6/6) | 310 \pm 23 |
| No seed | 0 % (0/4) | >478 |
| 10 % Brain homogenate from a BSE-infected cow‡ | 100 % (20/20) | 495 \pm 43 |

R10, Tenth round.

*The final dilution of the infected brain homogenate (macaque no. 7) in the R10 product was 6.4×10^{-11} .

†The PMCA product from the tenth round of amplification of PrP^{Sc}-positive WBCs (macaque no. 7).

‡Classical BSE (c-BSE) prion was inoculated in tga20 mice for comparison of infectivity.

The origin of PrP^{Sc} in WBCs may be the spleen and other lymphoid organs, as suggested previously (Saá *et al.*, 2006). As in humans, PrP^C is constitutively expressed in the WBCs of cynomolgus macaques (Holada *et al.*, 2007); therefore, WBCs of cynomolgus macaques can be deemed carriers or reservoirs of PrP^{Sc}. Our finding supports the idea that prion diseases may be transmitted via infected blood in primates, as has been previously seen in scrapie-infected sheep (Houston *et al.*, 2008) and CWD-infected deer (Mathiason *et al.*, 2006). An illustration for the appearance of PrP^{Sc} in the CSF and WBCs of intracerebrally infected macaques is shown in Fig. 6. PrP^{Sc} was found in the WBCs at clinical stages of the disease in macaques no. 7 and no. 11, but PrP^{Sc} was not detected in the WBCs of macaque no. 10 throughout the experimental period. Survival time of the BSE-infected macaques ranged from 1067 days to 1769 days. During the period from the onset of clinical signs to the terminal stage of the disease, PrP^{Sc} was detected in the CSF in all three BSE-infected macaques. The highest level of PrP^{Sc} in the CSF collected upon dissection was observed in macaque no. 10.

A previous study showed that elevated levels of 14-3-3 proteins, which are widely distributed in eukaryotes and

play an important role in various signal transduction systems involved in cell proliferation and division, were observed in the CSF of a simian vCJD model (Yutzy *et al.*, 2007). The increase of PrP^{Sc} in the CSF probably reflects the leakage of PrP^{Sc} from neuronal cells after cell destruction caused by PrP^{Sc} infection. We examined 14-3-3 γ levels in the CSF of the BSE-infected macaques (Fig. S4), and found that the signal intensity of the 14-3-3 γ protein became notable after disease onset (no. 7 and no. 10), or in the latter stages of the disease (no. 11). It is worth noting that the highest levels of the 14-3-3 γ protein were observed in the CSF of macaque no. 10 collected at dissection. Therefore, the disease might have progressed most rapidly after a shorter latent period (829 days) in macaque no. 10 than in macaques no. 7 (867 days) and no. 11 (1439 days). Faster accumulation of PrP^{Sc} in the brain may cause acute brain damage and result in death before a significant number of infected WBCs begin circulating in the peripheral blood. Macaques no. 7 and 10 both belonged to a breeding colony introduced from the Philippines, and no. 11 was derived from a Malaysian lineage. Thus, the different degrees of disease progression might be related to genetic factors affecting susceptibility or resistance to prion infection.

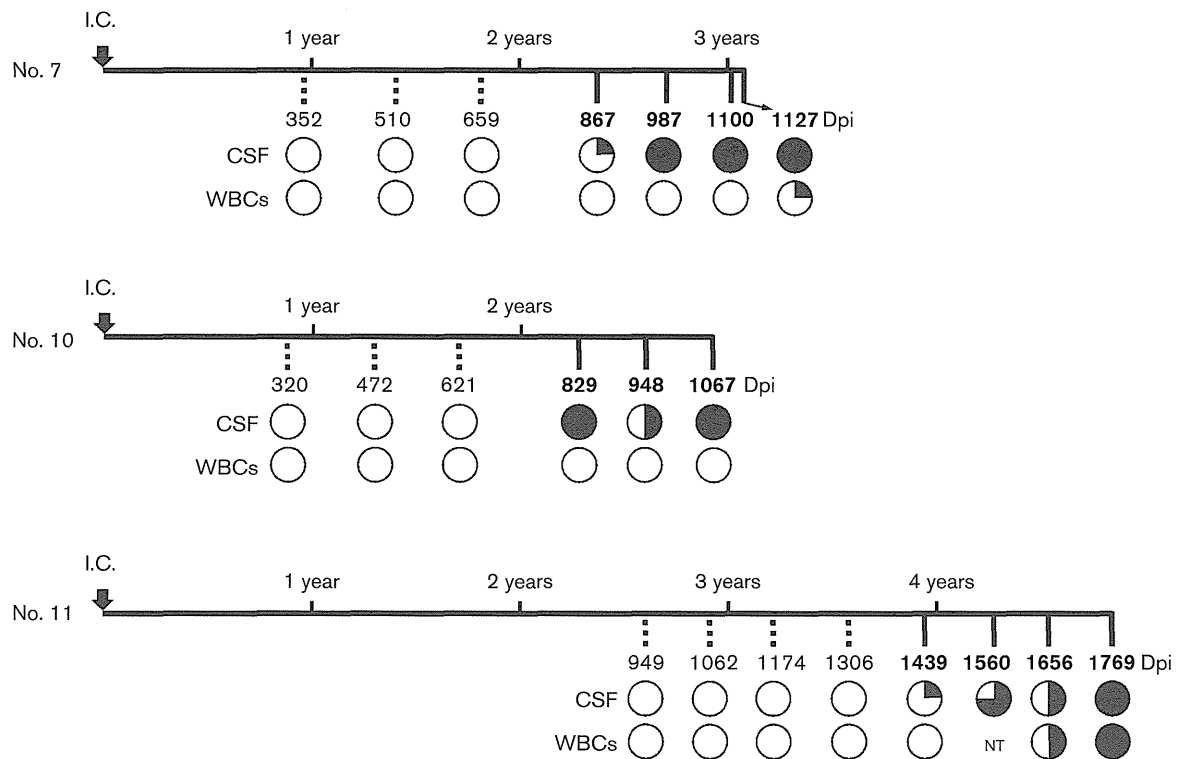


Fig. 6. Schematic illustration for the appearance of PrP^{Sc} in the CSF and WBCs of three BSE-infected macaques. After intracerebral inoculation (I. C.), the presence of PrP^{Sc} in CSF and WBCs was examined by serial PMCA during the asymptomatic (dotted line) and clinical stages (solid lines). Dpi, Days post-inoculation. Dpi written in boldface represents the clinical stages of the disease. Positive ratio of duplicate or quadruplicate samples was shown as open circle (0%), closed quadrant (25%), closed semicircle (50%), closed three quadrants (75%) and closed circle (100%). NT, Not tested.

More detailed studies are needed to clarify the above possibility.

In conclusion, we have developed a highly sensitive method that enables a detailed and precise examination of the distribution of PrP^{Sc} throughout the bodies of BSE-infected macaques. We are now conducting experiments analysing oral transmission of the BSE prion and transmission through blood transfusions from BSE-infected macaques. Using our method, PrP^{Sc} could notably be detected in bodily fluids obtained during the latent period of the disease in both primate models. Thus, the method developed in this study may be useful in furthering the understanding of tissue distribution of PrP^{Sc} in non-human primate models of CJD.

METHODS

BSE-infected macaques. This study on non-human primates was conducted according to the rules for animal care and management of the Tsukuba Primate Research Center (Honjo, 1985) and the guiding principles for animal experiments using non-human primates formulated by the Primate Society of Japan (Primate Society of Japan, 1986). The cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) examined in this study originated from the Philippines (no. 7 and 10) or Malaysia (no. 11), and were bred at Tsukuba Primate Research Center of the National Institute of Biomedical Innovation. Transmission experiments were approved by the Animal Welfare and Animal Care and Use Committee (approval ID: DS18-069R1) and Animal Ethics Biosafety Committee (approval ID: BSL3-R-06.01) of the National Institute of Biomedical Innovation. The brain homogenate (200 µl of a 10% brain homogenate) derived from a classical BSE (c-BSE)-infected 83-month-old Holstein (Iwata *et al.*, 2006) was intracerebrally administered to three male macaques (no. 7, 10 and 11) that were 24–29 months in age (Ono *et al.*, 2011a). The animals were housed in biosafety level three animal rooms, and their clinical status was monitored daily. After 35–59 months, the animals were euthanized by anaesthesia overdose following evidence of progressive neurological dysfunction, after which the animals were dissected. A healthy macaque (no. 8 or 28) was used as an uninfected control in the PMCA assay of tissues and bodily fluids. All macaques examined in this study were homozygous for methionine at codon 129 (MM) and homozygous for glutamic acid at codon 219 (EE).

Sample preparation. Peripheral nervous and lymphoid tissues were collected upon dissection and stored in small aliquots at –80 °C. Samples from each tissue were homogenized at 10% (w/v) in PBS. WBCs, plasma and CSF were also collected at several time points after inoculation. The blood samples (1.5 ml) were centrifuged at 1500 g for 15 min and the plasma and buffy coat fractions were recovered. Erythrocytes contaminated in the buffy coat fraction were haemolysed in distilled water, and the samples were stored at –80 °C until analysis.

Preparation of PrP^C substrates. To avoid contamination, normal brain homogenates were prepared in a laboratory in which infected materials had never been handled. Brains of a healthy cynomolgus macaque, squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), cow, PrP^C-overexpressing transgenic [Tg(BoPrP) 4092HOZ/Prnp^{0/0}, TgBoPrP] mouse (Scott *et al.*, 1997), PrP-knockout (PrP^{0/0}) mouse, WT mouse (ICR), and Syrian hamster were homogenized at a 20% (w/v) concentration in PBS containing a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). The brain homogenates were stored at –80 °C until further use. For analysis, the homogenates were mixed with an equal

volume of the elution buffer (PBS containing 2% Triton X-100, 8 mM EDTA) and incubated at 4 °C for 1 h with continuous agitation. After centrifugation at 4500 g for 5 min, the supernatant was used as the PrP^C substrate. When using brain homogenates of TgBoPrP mice, the supernatants were mixed in a 5:1 proportion of PrP^{0/0}:TgBoPrP, and this mixture was used as the PrP^C substrate.

PMCA. For the amplification of brain PrP^{Sc}, the BSE-infected brain homogenate of macaque no. 7 was diluted from 10^{–3} to 10^{–5} with normal brain homogenates from several animal species in an electron beam-irradiated polystyrene tube (total volume, 100 µl). Amplification was performed in the presence or absence of 1% (w/v) DSP, which has been shown to markedly improve *in vitro* amplification efficiency of bovine BSE PrP^{Sc} (Murayama *et al.*, 2010). Amplification was carried out with a fully automatic cross-ultrasonic protein activating apparatus (Elestein 070-CPR; Elekon Science Corporation), which had the capacity to generate high ultrasonic power (700 W). PMCA was performed by 40 cycles of sonication in which a 3 s pulse oscillation was repeated five times at 1 s intervals, followed by incubation at 37 °C for 1 h with agitation.

To examine the sensitivity of interspecies PMCA using the mouse PrP^C substrate for the detection of macaque BSE PrP^{Sc}, the 10% infected brain homogenate was serially diluted from 10^{–3} to 10^{–12} with mouse PrP^C substrate containing 1% (w/v) DSP (total volume, 80 µl) in an electron beam-irradiated eight-strip polystyrene tube specially designed for PrP^{Sc} propagation (Murayama *et al.*, 2010). To obtain maximum amplification efficiency and reduce non-specific background signal in Western blot analysis, a series of amplification steps were programmed as follows: PMCA was performed with 40 cycles of sonication in which a 15 s oscillation and subsequent incubations at 31 °C for 1 h were repeated 10 times; a 15 s oscillation and subsequent incubations at 33 °C for 1 h were repeated 10 times; an intermittent oscillation (3 s pulse oscillation was repeated five times at 1 s intervals) and subsequent incubations at 35 °C for 1 h were repeated 10 times; and finally intermittent oscillations (3 s pulse oscillation was repeated five times at 1 s intervals) and subsequent incubation at 37 °C for 1 h were repeated 10 times. The amplified product obtained after the first round of amplification was diluted 1:5 with the PrP^C substrate, and a second round of amplification was performed. This process was repeated for a maximum of six times.

For amplifying PrP^{Sc} in various tissues from BSE-inoculated macaques, the mouse PrP^C substrate containing 1% (w/v) DSP was mixed with a 1/10 volume of homogenized samples or bodily fluids (total volume 80 µl) in eight-strip polystyrene tubes. The WBC pellet (approx. 10⁴ cells) was dissolved in 8 µl of the elution buffer and used as a seed. Serial PMCA was then performed using the four-step amplification programme as described above.

Western blotting. After each round of amplification, samples of 10 µl were mixed with 10 µl of PK solution (100 µg PK ml^{–1}) and incubated at 37 °C for 1 h. The digested materials were mixed with 20 µl of 2 × SDS sample buffer and incubated at 100 °C for 5 min. The samples were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). After blocking, the membrane was incubated for 1 h with HRP-conjugated T2 mAb (Hayashi *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2010) at a 1:10 000 dilution. The T2 antibody, which recognizes a discontinuous epitope in amino acid residues 132–156 in the mouse PrP sequence, also reacts with hamster and monkey PrP. After washing, the blotted membrane was developed with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescence signals were analysed with the Light Capture system (ATTO).

Bioassay. A 10% brain homogenate from BSE-infected macaque (no. 7) was diluted to 10^{–4} with WT mouse PrP^C substrate containing 1% (w/v) DSP and amplified. The 1:5 dilution of the PMCA product

and its subsequent amplification was repeated nine times. The product from the tenth round was diluted 1:10 with PBS and inoculated intracerebrally (20 µl per mouse) into tga20 mice (Fischer *et al.*, 1996) that overexpress mouse PrP^C. Infectivity of the PMCA product from the tenth round of amplification of a PrP^{Sc}-positive WBC sample from macaque no. 7 obtained at dissection 1127 days p.i. was also examined. The PMCA product from the tenth round of amplification of no-seed sample was inoculated as negative control. In addition to the PMCA products, 10% brain homogenate of a c-BSE infected cow was also inoculated into tga20 mice to compare infectivity. The bioassay experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the National Institute of Animal Health (approval ID: 09-44) and were conducted in accordance with the guidelines for animal transmissible spongiform encephalopathy experiments of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the contributions of the animal caretakers. This study was supported by a grant for BSE research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H20-Shokuhin-Ippan-008), and in part, by a Grant-in-Aid from the BSE and other Prion Disease Control Project of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

REFERENCES

- Atarashi, R., Moore, R. A., Sim, V. L., Hughson, A. G., Dorward, D. W., Onwubiko, H. A., Priola, S. A. & Caughey, B. (2007). Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* 4, 645–650.
- Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H. & other authors (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17, 175–178.
- Belay, E. D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol* 53, 283–314.
- Brown, P., Rohwer, R. G., Dunstan, B. C., MacAuley, C., Gajdusek, D. C. & Drohan, W. N. (1998). The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 38, 810–816.
- Castilla, J., Gonzalez-Romero, D., Saá, P., Morales, R., De Castro, J. & Soto, C. (2008). Crossing the species barrier by PrP^(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell* 134, 757–768.
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. & Caughey, W. S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27–30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672–7680.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24, 519–550.
- Comoy, E. E., Casalone, C., Lescoutra-Étcheagaray, N., Zanusso, G., Freire, S., Marcé, D., Auvré, F., Ruchoux, M. M., Ferrari, S. & other authors (2008). Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS ONE* 3, e3017.
- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R. & Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9741–9746.
- Edgeworth, J. A., Farmer, M., Sicilia, A., Tavares, P., Beck, J., Campbell, T., Lowe, J., Mead, S., Rudge, P. & other authors (2011). Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 377, 487–493.
- Fischer, M., Rülcke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 15, 1255–1264.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. & Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794–796.
- Geissen, M., Krasemann, S., Matschke, J. & Glatzel, M. (2007). Understanding the natural variability of prion diseases. *Vaccine* 25, 5631–5636.
- Gibbs, C. J., Jr, Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M. & Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388–389.
- Glatzel, M., Rogivue, C., Ghani, A., Streffer, J. R., Amsler, L. & Aguzzi, A. (2002). Incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in Switzerland. *Lancet* 360, 139–141.
- Gough, K. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Spiropoulos, J., Thorne, L. & Maddison, B. C. (2012). The oral secretion of infectious scrapie prions occurs in preclinical sheep with a range of PRNP genotypes. *J Virol* 86, 566–571.
- Green, K. M., Castilla, J., Seward, T. S., Napier, D. L., Jewell, J. E., Soto, C. & Telling, G. C. (2008). Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog* 4, e1000139.
- Haley, N. J., Mathiason, C. K., Zabel, M. D., Telling, G. C. & Hoover, E. A. (2009a). Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+ deer. *PLoS ONE* 4, e7990.
- Haley, N. J., Seelig, D. M., Zabel, M. D., Telling, G. C. & Hoover, E. A. (2009b). Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS ONE* 4, e4848.
- Haley, N. J., Mathiason, C. K., Carver, S., Zabel, M., Telling, G. C. & Hoover, E. A. (2011). Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: potential mechanisms of prion shedding and transmission. *J Virol* 85, 6309–6318.
- Hayashi, H., Takata, M., Iwamaru, Y., Ushiki, Y., Kimura, K. M., Tagawa, Y., Shinagawa, M. & Yokoyama, T. (2004). Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein. *J Vet Med Sci* 66, 515–520.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448–450, 526.
- Hilton, D. A., Sutak, J., Smith, M. E., Penney, M., Conyers, L., Edwards, P., McCordle, L., Ritchie, D., Head, M. W. & other authors (2004). Specificity of lymphoreticular accumulation of prion protein for variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Pathol* 57, 300–302.
- Holada, K., Simak, J., Brown, P. & Vostal, J. G. (2007). Divergent expression of cellular prion protein on blood cells of human and nonhuman primates. *Transfusion* 47, 2223–2232.
- Honjo, S. (1985). The Japanese Tsukuba Primate Center for Medical Science (TPC): an outline. *J Med Primatol* 14, 75–89.
- Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Sisó, S., González, L., Jeffrey, M. & Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 112, 4739–4745.
- Ironside, J. W. (1998). Prion diseases in man. *J Pathol* 186, 227–234.
- Ironside, J. W. (2010). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Haemophilia* 16 (Suppl 5), 175–180.
- Iwata, N., Sato, Y., Higuchi, Y., Nohtomi, K., Nagata, N., Hasegawa, H., Tobiume, M., Nakamura, Y., Hagiwara, K. & other authors (2006).

- Distribution of PrP^{Sc} in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 59, 100–107.
- Knight, R. (2010).** The risk of transmitting prion disease by blood or plasma products. *Transfus Apher Sci* 43, 387–391.
- Kurt, T. D., Perrott, M. R., Wilusz, C. J., Wilusz, J., Supattapone, S., Telling, G. C., Zabel, M. D. & Hoover, E. A. (2007).** Efficient *in vitro* amplification of chronic wasting disease PrP^{RES}. *J Virol* 81, 9605–9608.
- Kurt, T. D., Seelig, D. M., Schneider, J. R., Johnson, C. J., Telling, G. C., Heisey, D. M. & Hoover, E. A. (2011).** Alteration of the chronic wasting disease species barrier by *in vitro* prion amplification. *J Virol* 85, 8528–8537.
- Lasmézas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. & Hauw, J. J. (1996).** BSE transmission to macaques. *Nature* 381, 743–744.
- Lasmézas, C. I., Fournier, J. G., Nouvel, V., Boe, H., Marcé, D., Lamoury, F., Kopp, N., Hauw, J. J., Ironside, J. & other authors (2001).** Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt–Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4142–4147.
- Lasmézas, C. I., Comoy, E., Hawkins, S., Herzog, C., Mouthon, F., Konold, T., Auvré, F., Correia, E., Lescoutra-Etcheagaray, N. & other authors (2005).** Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* 365, 781–783.
- Maddison, B. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Thorne, L., Bellworthy, S. J., Whitlam, G. C. & Gough, K. C. (2009).** Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J Virol* 83, 8293–8296.
- Maddison, B. C., Rees, H. C., Baker, C. A., Taema, M., Bellworthy, S. J., Thorne, L., Terry, L. A. & Gough, K. C. (2010).** Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis* 201, 1672–1676.
- Masujin, K., Shu, Y., Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Sata, T., Matsuura, Y., Iwamaru, Y., Imamura, M., Okada, H. & other authors (2008).** Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2, 123–128.
- Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J. & other authors (2006).** Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314, 133–136.
- Mathiason, C. K., Hayes-Klug, J., Hays, S. A., Powers, J., Osborn, D. A., Dahmes, S. J., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L. & other authors (2010).** B cells and platelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol* 84, 5097–5107.
- Murayama, Y., Yoshioka, M., Okada, H., Takata, M., Yokoyama, T. & Mohri, S. (2007).** Urinary excretion and blood level of prions in scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* 88, 2890–2898.
- Murayama, Y., Yoshioka, M., Masujin, K., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Fukuda, S., Onoe, S. & other authors (2010).** Sulfated dextrans enhance *in vitro* amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP^{Sc} and enable ultrasensitive detection of bovine PrP^{Sc}. *PLoS ONE* 5, e13152.
- Murayama, Y., Imamura, M., Masujin, K., Shimozaki, N., Yoshioka, M., Mohri, S. & Yokoyama, T. (2012).** Ultrasensitive detection of scrapie prion protein derived from ARQ and AHQ homozygote sheep by interspecies *in vitro* amplification. *Microbiol Immunol* 56, 541–547.
- Nemecek, J., Nag, N., Carlson, C. M., Schneider, J. R., Heisey, D. M., Johnson, C. J., Asher, D. M. & Gregori, L. (2013).** Red-backed vole brain promotes highly efficient *in vitro* amplification of abnormal prion protein from macaque and human brains infected with variant Creutzfeldt–Jakob disease agent. *PLoS ONE* 8, e78710.
- Notari, S., Molerés, F. J., Hunter, S. B., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Cali, I., Parchi, P., Shieh, W. J., Brown, P. & other authors (2010).** Multiorgan detection and characterization of protease-resistant prion protein in a case of variant CJD examined in the United States. *PLoS ONE* 5, e8765.
- Ono, F., Terao, K., Tase, N., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Kurosawa, A., Sato, Y. & other authors (2011a).** Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis* 64, 50–54.
- Ono, F., Tase, N., Kurosawa, A., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M. & other authors (2011b).** Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis* 64, 81–84.
- Orrú, C. D., Wilham, J. M., Hughson, A. G., Raymond, L. D., McNally, K. L., Bossers, A., Ligios, C. & Caughey, B. (2009).** Human variant Creutzfeldt–Jakob disease and sheep scrapie PrP^{RES} detection using seeded conversion of recombinant prion protein. *Protein Eng Des Sel* 22, 515–521.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J. & Cohen, F. E. (1993).** Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10962–10966.
- Peden, A. H., Ritchie, D. L., Head, M. W. & Ironside, J. W. (2006).** Detection and localization of PrP^{Sc} in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt–Jakob disease. *Am J Pathol* 168, 927–935.
- Peden, A. H., McGuire, L. I., Appleford, N. E., Mallinson, G., Wilham, J. M., Orrú, C. D., Caughey, B., Ironside, J. W., Knight, R. S. & other authors (2012).** Sensitive and specific detection of sporadic Creutzfeldt–Jakob disease brain prion protein using real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol* 93, 438–449.
- Primate Society of Japan (1986).** Guiding principles for animal experiments using nonhuman primates. *Primate Research* 2, 111–113.
- Prusiner, S. B. (1991).** Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515–1522.
- Prusiner, S. B. (1998).** Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363–13383.
- Rubenstein, R. & Chang, B. (2013).** Re-assessment of PrP^{Sc} distribution in sporadic and variant CJD. *PLoS ONE* 8, e66352.
- Saá, P., Castilla, J. & Soto, C. (2006).** Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 313, 92–94.
- Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. (2001).** Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813.
- Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D. & other authors (1997).** Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14279–14284.
- Shimizu, Y., Kaku-Ushiki, Y., Iwamaru, Y., Muramoto, T., Kitamoto, T., Yokoyama, T., Mohri, S. & Tagawa, Y. (2010).** A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol* 54, 112–121.
- Tattum, M. H., Jones, S., Pal, S., Collinge, J. & Jackson, G. S. (2010).** Discrimination between prion-infected and normal blood samples by protein misfolding cyclic amplification. *Transfusion* 50, 996–1002.

- Terry, L. A., Howells, L., Hawthorn, J., Edwards, J. C., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Simmons, H., Lizano, S., Estey, L. & other authors (2009).** Detection of PrP^{Sc} in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Virol* **83**, 12552–12558.
- Thorne, L. & Terry, L. A. (2008).** *In vitro* amplification of PrP^{Sc} derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol* **89**, 3177–3184.
- Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J. & Collinge, J. (2001).** Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**, 171–180.
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C. G. & Ma, J. (2010).** Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**, 1132–1135.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Estibeiro, K., Cousens, S. N., Smith, P. G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M. & Hofman, A. (1996).** A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921–925.
- Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D. & other authors (2006).** Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**, 2061–2067.
- Yoshioka, M., Imamura, M., Okada, H., Shimosaki, N., Murayama, Y., Yokoyama, T. & Mohri, S. (2011).** Sc237 hamster PrP^{Sc} and Sc237-derived mouse PrP^{Sc} generated by interspecies *in vitro* amplification exhibit distinct pathological and biochemical properties in tga20 transgenic mice. *Microbiol Immunol* **55**, 331–340.
- Yutzey, B., Holzner, E., Coulibaly, C., Stuke, A., Hahmann, U., Deslys, J. P., Hunsmann, G. & Löwer, J. (2007).** Time-course studies of 14-3-3 protein isoforms in cerebrospinal fluid and brain of primates after oral or intracerebral infection with bovine spongiform encephalopathy agent. *J Gen Virol* **88**, 3469–3478.

BSE の発生とその対策を振り返って

堀内基広[†]

北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

Looking back on the occurrence of BSE and its control measures

Motohiro HORIUCHI[†]*Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan*

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。わが国でも、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、スクレイピーは羊間で、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年代半ばにイギリスで出現し大流行した。BSEはイギリスで出現後、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年頃からイギリスで発生し、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、元来まれ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。イギリスでは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

[†] 連絡責任者: 堀内基広 (北海道大学大学院獣医学研究科教授)

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目 ☎・FAX 011-706-5293

E-mail: horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

[†] Correspondence to: Motohiro HORIUCHI (Laboratory of Veterinary Hygiene, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan

TEL・FAX 011-706-5293 E-mail: horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

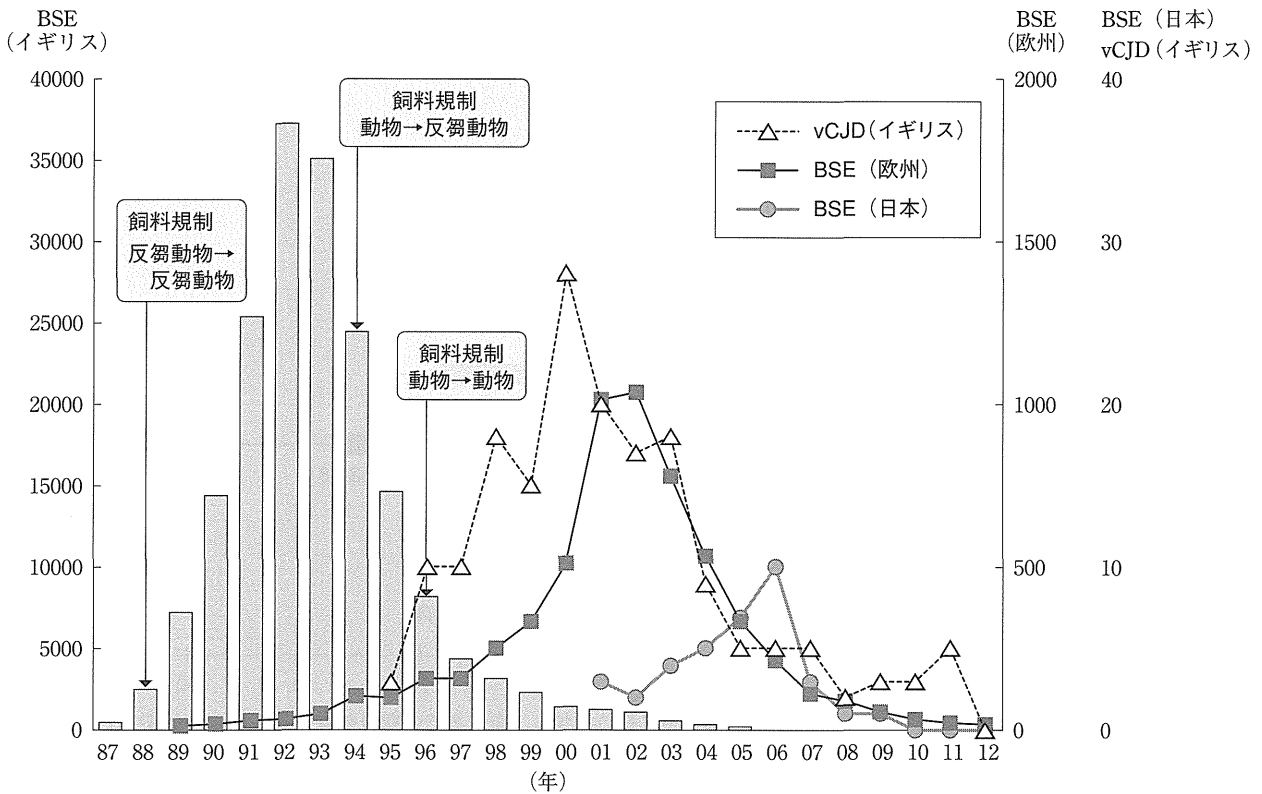


図1 イギリス、欧州及び日本におけるBSE発生数の経時変化とイギリスにおけるvCJD患者数の変化
棒グラフはイギリスにおけるBSE発生数、△はイギリスにおけるvCJD発生数、■は欧州におけるBSE発生数、●は日本におけるBSE発生数を示す。

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、イギリス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はこれまでイギリスで177例、イギリス以外の国で51例（日本：1名）の報告があるが、イギリスでの発生は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及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、欧州諸国でもイギリスと同様の飼料規制を導入しており、2003～2004年をピークにBSEの発生数は減少している。

わが国では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、出生後間もなく汚染飼料の給餌により感染を受ける。したがって、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。わが国で摘発されたBSE牛の出生

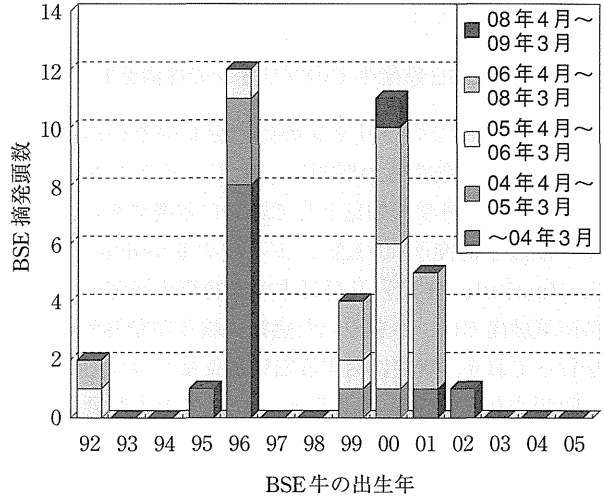


図2 日本で摘発されたBSE牛の出生年と摘発時期

時期には二つのピークがある。一つは1995～1996年生まれ、もう一方は1999～2001年生まれの子牛である（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、1995～1996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

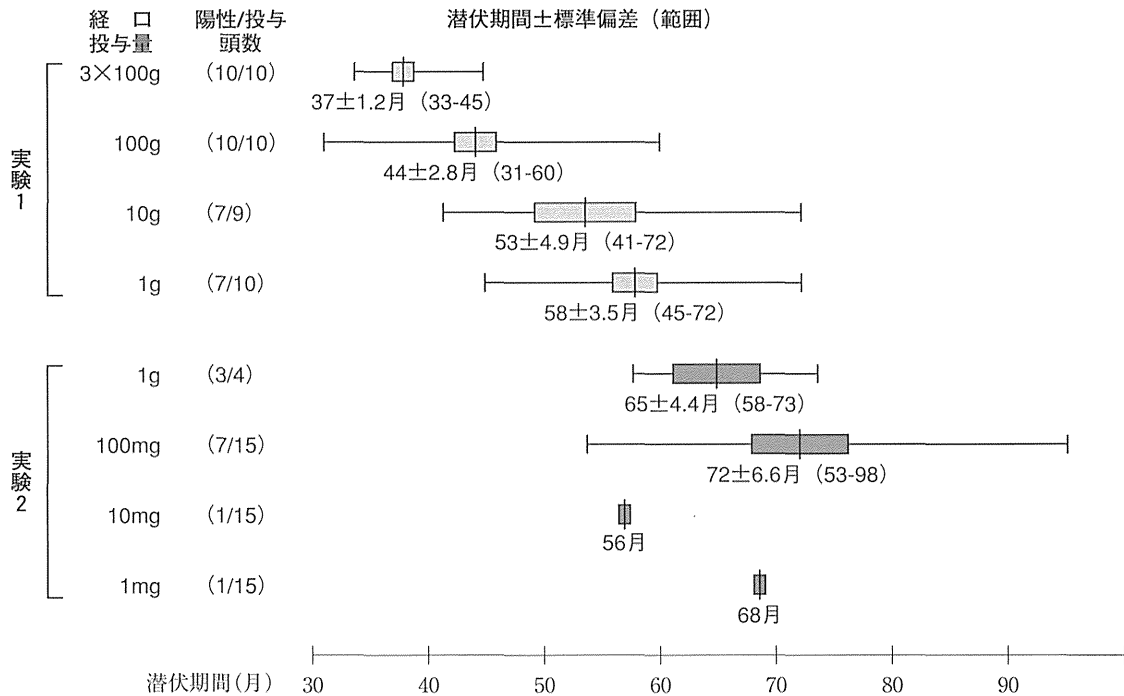


図3 BSEの牛への経口投与実験. BSE感染牛の脳乳剤を牛に経口投与し、発症までの期間を調べた. 投与量が減少するとともに、平均潜伏期が延長する. また、発症率（投与頭数に対する陽性頭数の割合）が低下する. 引用文献 [2] を改変.

(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. わが国で、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上での科学的知見として非常に重要である. イギリス獣医学研究所(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及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.

欧州委員会の調査によると、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カ月以降の脳、脊髄、背根神経節、三叉神経節、6カ月目の回腸遠位部にプリオンの感染性が確認されている. 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いだされた. スクレイビーも反芻動物のプリオン病であるが、BSE感染牛とスクレイビーの羊では、プリオンの体内分布が明らかに異なる. スクレイビー感染羊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

リオンはまれに検出される程度としている (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)).

羊スクレイビー、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 [1].

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、野外発症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) [2]. 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 カ月以降、5g 相当では34 カ月以降、1g 相当では44 カ月以降で延髄でPrP^{Sc}が検出されるようになった [2, 3]。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。わが国で実施してきたBSE 検査の結果、21 カ月齢及び23 カ月齢で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 カ月齢であり、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 カ月齢である。これらとともに、飼料規制導入前の2000年に生まれた牛である。その後、わ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カ月頃から臨床症状を呈するが、早い例では接種後10カ月で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カ月前にはPrP^{Sc}が検出可能となること示す結果である [4]。

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}及び感染性が検出されるようになることから [3]、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カ月かで回腸でPrP^{Sc}が検出される [5]。

BSE 野外発生例でも、副腎、坐骨神経、顔面神経及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 [6, 7]。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

イギリスにおける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。1980～1983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。イギリス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。

イギリスでは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、1992～1993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) があつたことから (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、すべ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 borne after the reinforced ban)。

イギリスでは、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カ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カ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カ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カ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カ月齢、2011年7月には72カ月齢に引き上げてもよいこととなった。また、2013年3月以降は、一部の加盟国で健康と畜牛のBSE検査を廃止してもよいとした。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。イギリスにおける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、その内容は欧州及びわ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、アメリカ・カナダ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できず、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及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、わが国におけるBSEの汚染度がかぎ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「管理されたりスク国」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掘り所に、国内のBSE対策の見直し及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「わが国における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カ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カ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カ月齢以下の牛で陽性例が見つかっていないこと、イギリスがBSEに高度に汚染されていた時期では、20カ月齢で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月及び2013年5月）を

BSEの発生とその対策を振り返って

表1 BSE対策

| | イギリス | 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カ月齢以上）の特定臓器（SBO）の人の食用禁止 | | |
| 1990年11月 | | 牛（6カ月齢以上）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カ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カ月齢以上） 動物由来飼料の全家畜への使用を一時的に禁止 | |
| 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 | | | アメリカ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カ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 | | | アメリカ・カナダの20カ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カ月齢超に変更可能（EU15） | |
| 2009年5月 | | | OIEのBSEステータス：管理されたりスクに認定 |
| 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カ月齢超に変更可能（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 | | | アメリカ、カナダ、フランスから30カ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よい（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カ月齢超に変更 |
| 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カ月齢超に変更 |

表2 各国における牛の特定危険部位

| | 日 本 | | アメリカ, 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カ月齢超の頭部 (舌, 頬肉を除く) | 30カ月齢超の頭部 | 12カ月齢超の頭部 | 30カ月齢超の 頭部 | |
| 扁桃 | 全月齢 | 全月齢 | 全月齢(アメリカ) 30カ月齢超(カナダ) | 全月齢 | 全月齢 | |
| 脊髄 | 全月齢 | 30カ月齢超 | 30カ月齢超 | 12カ月齢超 | 30カ月齢超 | 条件なし |
| 脊柱(背根神 経節を含む) | 全月齢 | 30カ月齢超 | 30カ月齢超 | 30カ月齢超 | 30カ月齢超 | |
| 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) | |



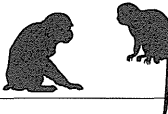

表3 各国における BSE 検査の対象月齢と変遷

| | 日 本 | フランス | オランダ | アメリカ・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カ月齢超の死 亡牛 (2003年4月～) | 24カ月齢超の高リス ク牛(2000年6月～) | 24カ月齢超の高リス ク牛(2000年～) 48カ月齢超の高リス ク牛(2009年1月～) | 30カ月齢超の高 リスク牛の一部 (2004年から拡 大サーベイラン ス) | 30カ月齢超の高リス 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カ月齢超 (2013年4月～) 48カ月齢超 (2013年7月～) | 30カ月齢超 (2001年1月～) 24カ月齢超 (2001年7月～) 30カ月齢超 (2004年7月～) 48カ月齢超 (2009年1月～) 72カ月齢超 (2011年7月～) | 30カ月齢超 (2001年～) 48カ月齢超 (2009年1月～) 72カ月齢超 (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) | |

受けて、食用に供される牛の BSE 検査の対象月齢が 30 カ月齢以上 (2013 年 4 月施行, 実際にこれを実施した自治体はない), 続いて 48 カ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 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变化に関する科学的知見も, 「わが国における 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 カ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 カ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 カ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. アメリカ・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 カ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

| 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 (脳名接種, 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型及びL型非定型BSEの異種動物への伝達試験

つ方も多いと思われるが、食品安全委員会では可能なかぎり科学的知見に基づく慎重な議論を行った。当時はアメリカ・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、アメリカ・カナダとわ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、アメリカ・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カ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カ月齢以下のアメリカ・カナダの牛に由来する牛肉等とわ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カ月齢以下) 及びオランダ (12カ月齢以下) 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カ月齢以下の牛肉が輸入されても、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はイギリス由来であり、同じ病原体が牛

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 |
| 合計 | 38 | 27 | 2 | 7 | 74 | 189,357 |

引用文献[9, 10]及び「牛海綿状脳症(BSE)対策の見直しに係る食品健康影響評価(食品安全委員会2012年10月)」(http://www.fsc.go.jp/sonota/bse/bse_hyoka_201210.pdf)を統合

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ほとんどの国で非定型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ほとんどである。フランスでの出生コホートの