

201522019A

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 27 年度 総括・分担研究報告書

平成 28 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 27 年度 総括・分担研究報告書

平成 28 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 27 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	准教授
岩丸 祥史	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構農研機構動物衛生研究所	主任研究員

目次

I.	総括研究報告書（平成 27 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.	潜在的 L-BSE のモニタリングに使用可能な RT-QuIC 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 of 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 of 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.	異なるエピトープを認識する 2 種の抗 PrP 抗体を用いた免疫染色による・・・・・・・・	35
	L 型 BSE 感染牛脳組織 of PrP ^{Sc} の検出	
	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 of 経時的解析・・・・・・・・	41
	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 of 生物学的性状解析・・・・・・・・・・・・・・・・	45
	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 of 末梢組織における異常型プリオンタンパク質蓄積 of 解析・・・	53
	研究分担者 岩丸 祥史（農研機構・動物衛生研究所）	
III.	研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	57
IV.	研究成果 of 刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	59

I. 総括研究報告書

平成 27 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 27 年度は、以下に述べる研究成果が得られた。

昨年度に引き続き L-BSE 脳内接種牛の 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} が検出されることが明らかとなった。昨年度、ハムスターが L-BSE の病態を解析する実験動物として有用であることを示したが、この実験系を用いて L-BSE は末梢組織への親和性が著しく低いことを明らかにした。

L-BSE のヒトへの感染リスクの推定のために L-BSE を経口接種して約 3 年が経過したカニクイザルの一頭の唾液から、PMCA 法により PrP^{Sc} が検出された。L-BSE が経口的にヒトに感染する可能性を示唆する結果であり、今後も継続して経過を観察していく。H-BSE のヒトへの感染リスクを推定するために、カニクイザル 2 頭に H-BSE ウシ脳乳剤の経口接種を開始した。ヒト PrP 過発現マウス (TgHuPrP) を新たに作製し、C-, L-, H-BSE を脳内接種して伝達性を調べた結果、L-BSE は TgHuPrP に伝達するが H-BSE は伝達しなかった。これは、ヒトは L-BSE に感受性であるが、H-BSE への感受性は低い可能性を示唆する結果である。BSE 検査に使用されている市販 ELISA キットが、H-BSE ウシの摘発に有効であることを確認した。

組換えシカ PrP (rCerPrP) を基質に用いることで、潜在的な L-BSE の存在を調査可能なレベルの感度を有し、かつ高濃度の組織乳剤存在下でも反応が阻害されない RT-QuIC 法が確立できた。実用レベルの RT-QuIC 法が確立できたことから、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・准教授）

岩丸 祥史（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・主任研究員）

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指して、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 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、発症前に PrP^{Sc} が検出される時期を明らかにする。
- L-BSE 実験感染牛の発症牛の可食部位にプリオン感染価が存在するか否かを、ウシ PrP 過発現マウス (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ハムスターが有用であることから、L-BSE を脳内接種あるいは腹腔内接種したハムスターの PrP^{Sc} の組織分布を解析して、L-BSE の体内伝播経路を調べる。

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、採取可能な体液から PMCA 法を用いて PrP^{Sc} の検出を試みる。
- 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する。
- ヒト PrP 過発現マウス (TgHuPrP) を新たに作製し、C-, L-, H-BSE を脳内接種して伝達性を調べることで、ヒトが非定型 BSE に感受性であるかを推測する。
- 市販 BSE 検査キットの H-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

- ・ 潜在的な L-BSE の存在を調査するため、高濃度の組織乳剤存在下でも高感度に L-BSE を検出できる、実用レベルの RT-QuIC 法を構築する。
- ・ 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、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。接種後 1.7 および 4.2 ヶ月で安楽殺した各一頭の牛の脳内では明瞭な PrP^{Sc} の蓄積は検出されなかったが、接種後 7.5 および 9.1 ヶ月では、脳幹部の他、小脳、視床に PrP^{Sc} が検出された。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 ヶ月前頃には PrP^{Sc} が検出されるようにな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

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。接種後 200 日を経過したが、これまで伝達は認められておらず、今後も観察を継続する。

1-3) L-BSE 接種ハムスターの解析

昨年度、ハムスターが L-BSE の病態解析モデルとなることを示した。L-BSE 接種ハムスターでは末梢組織で PrP^{Sc} の蓄積が認められず、中枢神経系組織で血管周囲や脳室周囲器官で PrP^{Sc} の蓄積が認められることから、脳脊髄液を介して、あるいは血行性に中枢神経系組織内で蓄積部位が拡大することが示唆された。

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

人への感染リスクを推定するために開始したカニクイザルでの L-BSE の経口接種試験で、接種後 3 年を経過した時点で明らかな臨床症状は認められていないが、1 頭のサルの唾液はら、PMCA 法により PrP^{Sc} が検出された。L-BSE を脳内接種したカニクイザルでも発症前に、尿や唾液中から PrP^{Sc} が検出される。従って、これは L-BSE が経口ルートでヒトに感染する可能性を示唆する結果と考えられる。

2-2) H-BSE のカニクイザルの経口接種試験

L-BSE と同様に、H-BSE のヒトへの感染リスクを推定するために、本年度新たに、カニクイザルに H-BSE を経口接種し、経過観察を継続している。

2-3) TgHuPrP を用いたヒトの非定型 BSE 感受性の推定

ヒト PrP 過発現マウス (TgHuPrP) を新たに作製し、C-, L-, H-BSE を脳内接種した L-BSE は TgHuPrP を高発現する Tg マウスには attack rate 100% で伝達したが、低発現する Tg マウスへは伝達したが attack rate は低かった。C-BSE は HuPrP を高発現する Tg マウスに attack rate が低いながら伝達が認められた。しかし H-BSE はいずれの Tg にも伝達しなかった。

2-4) 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 (T ニッピブル BSE) は、H-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
組換えシカ PrP (rCerPrP) を基質に用いること
で、潜在的な L-BSE の存在を調査可能なレ
ベルの感度を有し、かつ高濃度の組織乳剤存在
下でも反応が阻害されない RT-QuIC 法が確立
できた。L-BSE の潜在的な存在を調査する実用
レベルの RT-QuIC 法が完成したと言える。

3-2) L-BSE が C-BSE の起源となる可能性。

L-BSE 感染脳乳剤を 70°C~150°C で加熱処理
し、その後 C-BSE を特異的に増幅する PMCA
法を用いて PrP^{Sc} を増幅した。しかし、熱処理
後の L-BSE 脳乳剤から C-BSE 様の PrP^{Sc} は増
幅されなかった。

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

昨年解析した接種後 4.7 ヶ月より前の段階では
PrP^{Sc} は検出されず、接種後 7.5 月では脳内の PrP^{Sc}
蓄積部位が広がり、脳内接種後 11 ヶ月頃から臨
床症状が確認されることから、臨床症状が出現す
る約 6 ヶ月前頃から PrP^{Sc} が検出できることが示
唆された。

昨年度、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ことは重要であり、現在
TgBovPrP を用いたバイオアッセイにより感染価
の有無を調べている途中である。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する
研究

人への感染リスクを推定するために開始した
カニクイザルでの L-BSE の経口接種試験では、接
種後 3 年以上を経過した時期に 2 頭中 1 頭の唾液
が PMCA 法で PrP^{Sc} 陽性と判定された。このこと
は L-BSE が経口ルートでヒトに感染する可能性
を示唆する重要な結果であるので、今後も継続し
て観察、体液の採取等続ける。

新たに作製した TgHuPrP を用いた、C-, L-, H-BSE
の接種試験では、ヒトの感受性は L-BSE, C-BSE,
H-BSE の順に低下することが示唆された。

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

rCerPrP を基質として RT-QuIC を実施した場合、
高濃度の脳乳剤存在下でも、Tg マウスを用いるバ
イオアッセイよりも高感度に L-BSE を検出でき
た。潜在的な L-BSE が存在する可能性を調査す
るために必要な性能を有する RT-QuIC 法は確立
できたが、C-BSE の検出感度は高くないため、基質
をハタネズミ (Bank vole) 由来あるいは他の rPrP に
置き換えて、実用レベルの C-BSE 調査用 RT-QuIC
を構築する必要がある。また、H-BSE を高感度に
検出する RT-QuIC 法の条件検討も今後の課題であ
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 ヶ月前頃から PrP^{Sc} が検出されるこ
とが明らかとなった。
- ・ ハムスターを用いた L-BSE の病態解析から、
L-BSE は末梢組織への親和性が乏しいこと、
中枢神経系組織内で、血行性あるいは血管
周囲器官が L-BSE の組織内伝播に参与する
可能性が示唆された。

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の 2 頭
中 1 頭で、接種後 3 年経過した時点で、唾
液から微量の PrP^{Sc} が検出された。この結果
は L-BSE が経口ルートでヒトに感染する可
能性を示唆する重要な結果であり、継続的
に PrP^{Sc} の検出を実施する必要がある。
- ・ TgHuPrP マウスへの伝達試験の結果から、
ヒトに感受性の高いと思われる順は、
L-BSE > C-BSE > H-BSE と推測された。
- ・ BSE スクリーニング検査に使用されている
市販キットが、H-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

- ・ rCerPrP を用いることで、高濃度の組織乳存
在下でも実用レベルの感度で L-BSE を検出
可能な RT-QuIC 法を確立した。

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. 潜在的 L-BSE のモニタリングに使用可能な RT-QuIC 法の確立

研究分担者 堀内 基広 北海道大学大学院・獣医学研究科

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

研究要旨

我が国では定型 BSE の清浄化に伴い、BSE に対する管理措置が緩和される方向で進んでいる。しかし、非定型 BSE の性状は不明な点が多いことから、主に高齢牛を対象とした適切な管理措置の実施のために非定型 BSE に関する科学的知見や、実際の存在状況等の集積が必要である。Real-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法は、高感度かつ簡便に異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の存在を検出できる方法として広く用いられるようになった。しかし、RT-QuIC 反応は夾雑物に阻害されやすく、高濃度の組織乳剤に微量存在する PrP^{Sc} の検出ができない場合がある。今回、反応阻害を回避する方法として、アルコールおよび免疫沈降法による PrP^{Sc} の濃縮法を検討したが、実用可能な成績は得られなかった。また、異種の組換え PrP としてシカ PrP (rCerPrP) を用いて非定型 (L-) および定型 (C-) BSE の RT-QuIC 法を検討した。その結果、rCerPrP を基質として用いることで、被検脳乳剤が最高濃度でも L-BSE の PrP^{Sc} の検出が可能であり、かつ検出感度も 10⁻⁹ 以上と ELISA および遺伝子改変マウスを用いるバイオアッセイよりも高感度に L-BSE を検出できる RT-QuIC 法が確立できた。

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、飼料規制などの管理措置が有効に機能して、現在その発生は制御下にある。しかし、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、主に PrP^{Sc} の分子性状から L 型、H 型に分類され、これまでに 90 例が確認されている。非定型 BSE はウシで自然発生するプリオン病である可能性も指摘されている。我が国では定型 BSE の清浄化に伴い、BSE に対する管理措置が緩和される方向で進んでいる。しかし、非定型 BSE の性状は不明な点が多いことから、主に高齢牛を対象とした管理措置の継続が望まれている。適切な管理措置の策定のために非定型 BSE に関する科学的知見や、実際の存在状況等の集積が必要である。Real-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法は、簡便かつ高感度に PrP^{Sc} を検出可能な方法である [1, 2]。実際に、スクリーニングで使用されている ELISA よりも 1000 倍

以上高い感度で PrP^{Sc} を検出でき、バイオアッセイを上回る感度が得られる。しかし、RT-QuIC 反応は夾雑物に影響を受けやすく、高濃度の組織乳剤により反応が阻害されるため、組織に微量に存在する PrP^{Sc} の検出が難しい場合がある。そこで潜在的な非定型 BSE の存在を調べるために、高濃度の組織乳剤中でも ELISA よりも高感度に、バイオアッセイと同等以上の感度を有する RT-QuIC 法の確立を行った。

B. 研究方法

1) 組換えタンパク質の精製

組換えシカ PrP (rCerPrP) を発現させるために原核細胞発現ベクター pET11a にシカ PrP コドン 23-231 をコードする DNA 断片をクローニングした。pET11a [マウス(Mo)PrP あるいは rCerPrP]、pET41a [ハムスター(Ha)PrP]を、BL21(DE3)pLys に導入し、自動誘導培地 (Magic Media, Invitrogen) で 30 時間、37°C で培養した。菌体を回収し、Cell lytic B cell lysis reagent (Sigma) で処理後、

benzonase と lysozyme で処理し、封入体を回収した。封入体を 6 M GdnHCl, 100 mM NaH₂PO₄ および 10 mM Tris を含む変性 buffer (pH 8.0) で可溶化し、Ni-NTA アフィニティー担体 (Qiagen) に結合させた。その後、カラムに充填し、GdnHCl の濃度を 18 時間かけて 0 M にすることで担体上で PrP 分子をリフォールディングさせた。その後、500 mM Imidazole, 10 mM Tris (pH 5.8) を用いて 0~500 mM の Imidazole 濃度勾配により PrP 分子を溶出した。溶出した PrP 分子を Mili-Q に対して透析し、0.2 μm のフィルターを通したものを最終精製物とした。

2) RT-QuIC 法

プレートリーダーとして TECAN F200 を用いた。プレートは 96 well optical bottom plate (Thermo Fisher) を使用し、下方測定により蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 500 mM NaCl, 100 μM EDTA, 10 μM ThT および 60 μg/ml rPrP を基本とし、必要に応じて、NaCl および rPrP の濃度、pH および SDS 濃度を変更した。また攪拌スピードは 432-218 rpm の範囲で変化させた。ThT の蛍光は励起フィルター 430 nm および吸収フィルター 485 nm で検出した。

プリオン感染脳材料として、L-BSE (JP24) および C-BSE (JP2) の脳乳剤を用いた。陰性対照として、BSE 非感染牛脳を用いた。

(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で承認された動物実験計画書(実験番号 13058, 13059)に従って実施した。

C. 研究結果

1) 高濃度の脳乳剤による RT-QuIC 反応の阻害

RT-QuIC の反応系の脳乳剤の終濃度が最高で 0.5% (5×10^{-3}) から 1% (10^{-2}) となる。この濃度で RT-QuIC 反応が阻害されるか否かを確認するために、rHaPrP を基質、L-BSE (JP24) 脳乳剤希釈列を seed として RT-QuIC を行った。脳乳剤の終濃度が 5×10^{-3} , 5×10^{-4} では、陽性反応が得られなかったが、それ以下の濃度では陽性となり、調べた 5×10^{-8} の希釈まで陽性となった (図 1)。従って、

rHaPrP を基質として用いた場合、高濃度の牛脳の乳剤は RT-QuIC 反応を阻害することが確認された。

2) 各種 PrP^{Sc} 濃縮法の応用

脳乳剤中に存在されると予想される RT-QuIC 反応の阻害物質の除去を目的として、リンタングステン酸 (NaPTA) 沈殿法、および各種アルコールによる PrP^{Sc} の濃縮を行い、その後 RT-QuIC を実施した。NaPTA を用いた場合、 5×10^{-3} で 3 ウェル中 3 ウェルが陽性 (3/3) となり、夾雑物の除去が可能となったように思われたが、検出限界が 5×10^{-5} と著しく低下した。アルコール沈殿により PrP^{Sc} を濃縮した場合、 5×10^{-3} で陽性となる例はなく、また、PBS で希釈した場合 (未処置) と比較して、検出感度も低下した (表 1)。

PrP^{Sc} を濃縮する方法として免疫沈降がある。そこで L-BSE (JP24) の脳乳剤希釈列 ($10^{-2} \sim 10^{-9}$) を作製して、PrP^{Sc} 特異抗体 mAb 8D5 により免疫沈降を行い、rMoPrP を基質、沈降物を seed として RT-QuIC を行った。その結果、最高濃度 (10^{-2}) で陽性となったが、検出限界が 10^{-4} 程度であった。この値は、ELISA よりは 10~100 倍程度高いが、バイオアッセイの 1/10~1/100 程度の感度と予測される (図 2)。同様の実験を C-BSE (JP2) を用いて行ったところ、RT-QuIC で陽性反応は認められなかった。従って、mAb8D5 は C-BSE プリオンの RT-QuIC による増幅を阻害すると考えられた (図 2)。

3) rCerPrP を基質とした L-BSE プリオンの検出

我々は、シカ慢性消耗病 (CWD) の RT-QuIC による診断系を構築する過程で、full length の rCerPrP (23-231) が高感度に CWD プリオンを検出可能であることを見出した。そこで、rCerPrP を基質として、L-BSE (JP24) の希釈列を seed として RT-QuIC を行った。この際、希釈列は BSE 陰性の牛脳乳剤を用いて希釈列を作製した。従って全ての検体の脳乳剤の終濃度は 5×10^{-3} である。L-BSE (JP24) の濃度が最も濃い 5×10^{-3} でも 3 ウェル中 3 ウェルで陽性 (3/3) となり、最も低い 5×10^{-10} でも 3 ウェル中 1 ウェルが陽性 (1/3) となった。従って、RT-QuIC の基質として rCerPrP を用いることで、PrP^{Sc} の濃縮等を行うことなく、高濃度脳乳剤から高感度に L-BSE プリオンを検出できることが判明した (図 3)。しかし、rCerPrP を用いても、高濃度脳乳剤から高感度に C-BSE を検出することはできなかった (結果は示さず)。

D. 考察

RT-QuIC を動物プリオン病の検査に応用する場合、組織乳剤による反応阻害が問題となる。実際の高感度検出系では、組織中に微量に存在するプリオンの検出が求められるので、できるだけ高濃度の組織乳剤を使用する必要がある。昨年度の研究報告では、rHaPrP と rMoPrP を基質として用いることで、L-BSE と C-BSE を鑑別できることを報告した。rMoPrP は L-BSE および C-BSE のどちらとも増幅するが、rHaPrP を用いた場合 L-BSE のみ増幅される。しかし、rMoPrP および rHaPrP とともに、高濃度の牛脳乳剤存在下では BSE プリオンを検出することができなかった。

この問題を解決するために、NaPTA 沈殿、アルコール沈殿、および PrP^{Sc} 特異抗体による免疫沈降を試みたが、実用レベルに達する改善には至らなかった。しかし、rCerPrP を基質として用いることで、L-BSE プリオンを高濃度脳乳剤から高感度に検出することが可能となった。TgBovPrP を用いたバイオアッセイでは脳乳剤の希釈として 10⁶ まで、感染価が認められている。この脳乳剤は RT-QuIC の希釈の 5 x 10⁸ に相当する。RT-QuIC 法では 5 x 10¹⁰ まで L-BSE プリオンが検出されたことから、rCerPrP を基質とした L-BSE プリオン検出用の RT-QuIC 法はバイオアッセイよりも 10 ~ 100 倍感度が高いと考えられる。

また、反応系の脳乳剤最高濃度である 5 x 10³ でも L-BSE プリオンを検出できたことから、本法は、脳組織中に微量に存在する L-BSE を迅速、簡便、かつ高感度に検出することを目的とした調査に応用可能である。

E. 結論

L-BSE プリオンを検出する RT-QuIC 法として rCerPrP を基質として用いることで、高濃度脳乳剤から高感度に L-BSE プリオンを検出できる実用レベルの性能を有する RT-QuIC 法を確立できた。

[参考文献]

- 1) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*, 17:

175-178, 2010.

- 2) Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog*, 6: e1001217, 2010.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagasawa Y, Takahashi Y, Itani W, Watanabe H, Hidaka Y, Morita S, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Imamura M, Yokoyama T, Horiuchi M, Sakaguchi S, Mohri S, Rose M, Nochi T, Aso H. Prion protein binds to aldolase A of bovine intestinal M cells. *Open J Vet Med*, 05 (03): 43-60, 2015.
- 2) Saijo E, Hughson A, Raymond G, Suzuki A, Horiuchi M, Caughey B. PrP^{Sc}-Specific C-terminal Antibody Reveals Conformational Differences between Prion Strains. *J Virol*, in press
- 3) Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Establishment of a simple cell-based ELISA for the direct detection of abnormal isoform of prion protein from prion-infected cells without cell lysis and proteinase K treatment. *Prion*, in press

2. 学会発表

- 1) Horiuchi M. "Immuno- and cell therapy as possible treatment for prion diseases" "Therapeutic approaches to prion disease and other neurodegenerative conditions associated with protein misfolding" Banbury Center, Cold Spring Harbor, USA, Sept 16-18, 2015
- 2) Kuroda M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of activation state of astrocytes with the progression of prion diseases. Prion2015, Fort Collins, Colorado, USA, May, 26-29, 2015.
- 3) Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R,

Horiuchi M. Highthroughput detection of PrP^{Sc} from prion-infected cells without PK treatment: Cell-based ELISA for novel screening method for anti-prion compounds. Prion2015, Fort Collins, Colorado, USA, May, 26-29, 2015.

- 4) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Flow cytometric detection of PrP^{Sc} in neurons from prion-infected mouse brain. Prion2015, Fort Collins, Colorado, USA, May, 26-29, 2015.
- 5) Saijo E, Hughson E, Raymond G, Horiuchi M, Caughey M. Scrapie-specific C-terminal antibody reveals conformational differences between prion strains. Prion2015, Fort Collins, Colorado, USA, May, 26-29, 2015.
- 6) Tanaka M, Masujin K, Yamasaki T, Suzuki A,

Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of PrP^{Sc}-specific staining with two anti-PrP monoclonal antibodies in immuno-cytochemistry. APPS2015, Kanazawa, Ishikawa, Japan, Sept, 4-5, 2015,

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

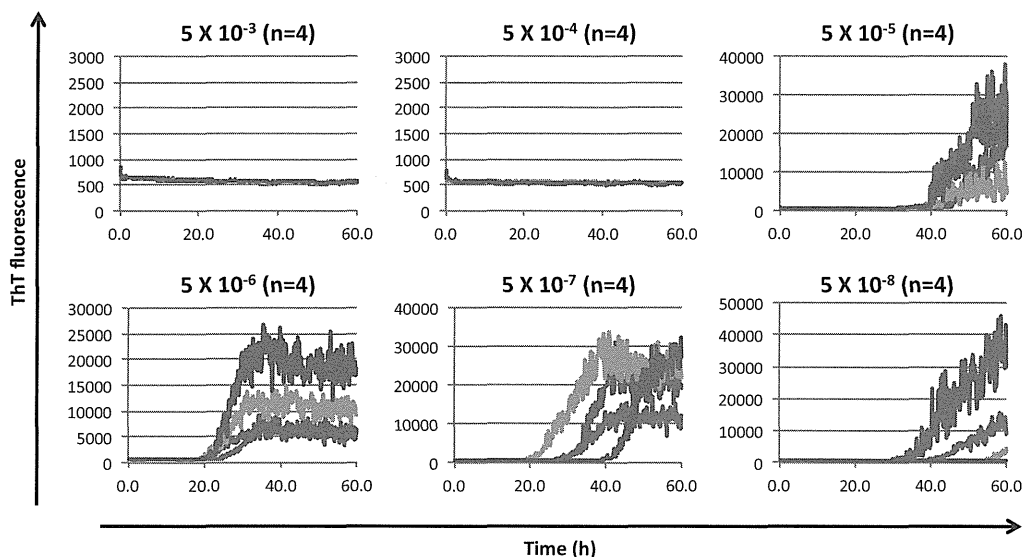


図 1. 高濃度の脳乳剤による RT-QuIC 反応の阻害

L-BSE (JP24) の脳乳剤を PBS で 10 倍段階希釈し、RT-QuIC 反応液中の終濃度が 5×10^{-3} (0.5%) から 5×10^{-8} となる条件で、rHaPrP を基質として RT-QuIC を行った。N=4

沈殿法	希釈率	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	5×10^{-6}	5×10^{-7}	5×10^{-8}	5×10^{-9}
未処理		0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
NaPTA		3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Metahol		0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3
Ethanol		0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Isopropanol		0/3	3/3	2/3	1/3	0/3	1/3	0/3
2-Butahol		0/3	0/3	2/3	2/3	2/3	0/3	0/3

表 1. 各種 PrP^{Sc} 濃縮法の RT-QuIC 阻害物質除去効果

L-BSE (JP24) の脳乳剤希釈列から、表に示す方法により PrP^{Sc} を沈殿・濃縮後に rHaPrP を基質として RT-QuIC を行った (N=3)。分子は陽性ウエル数、分母は実施ウエル数を示す。

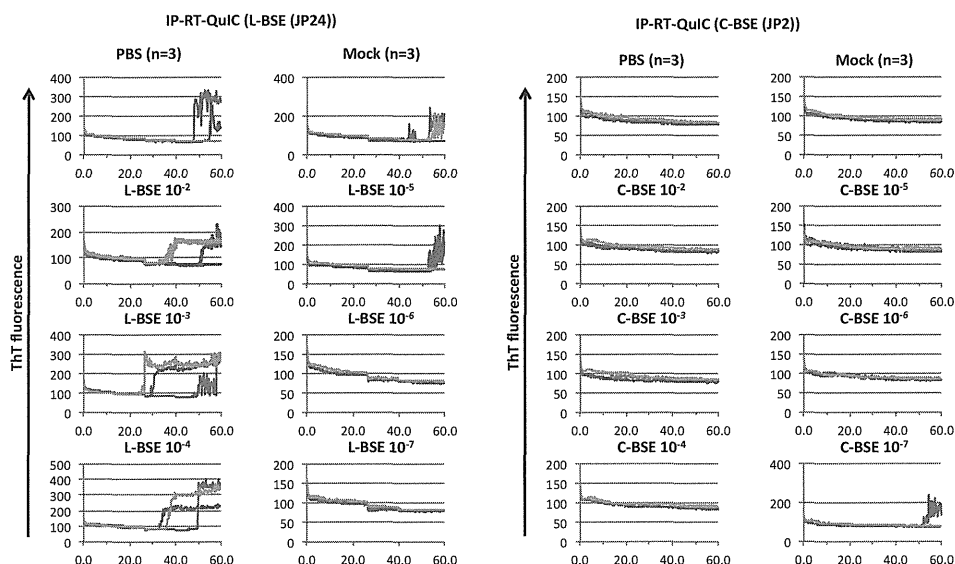


図 3. 免疫沈降法 (IP) -RT-QuIC 法による BSE プリオンの検出

L-BSE (JP24) (左半分) および C-BSE (JP2) (右半分) の脳乳剤希釈例 ($10^{-2} \sim 10^{-9}$) から PrP^{Sc} 特異抗体 mAb8D5 を用いて免疫沈降を行い、沈殿物を当初の液量に懸濁した後、rMoPrP を基質として RT-QuIC を行った。

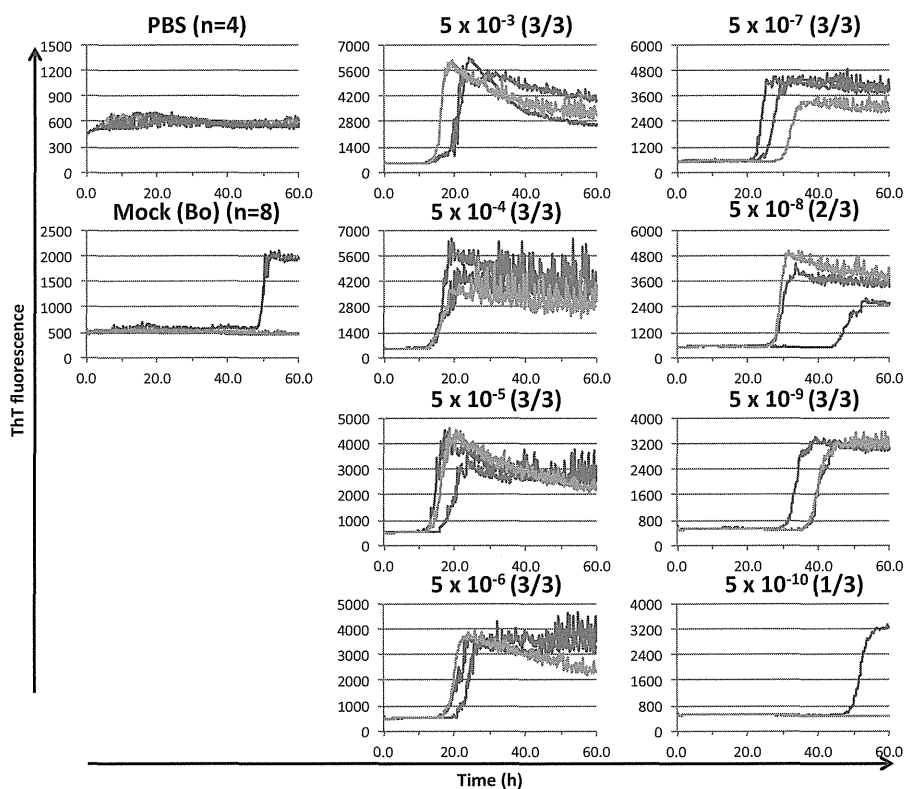


図 4. rCerPrP を用いた RT-QuIC 法による L-BSE プリオンの検出

L-BSE (JP24)の脳乳剤を BSE 非感染脳乳剤で 10 倍段階希釈した。反応液中のウシ脳乳剤の濃度を 5×10^{-3} に統一した。

2. 非定型 BSE PrP^{Sc}を検出する RT-QUIC 法の開発

分担研究者 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 小野香織 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

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) により非典型 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とともにこの手法を応用し、定型 BSE (C-BSE) との鑑別することを目的としている。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せず、さらにこの性質は 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 が原理的に鑑別可能である。興味深いことに Round4 以降は rMoPrP、rHaPrP の両者に反応するフィブリルが生成された。これらの結果は RT-QUIC 法では非特異的なフィブリルがより形成されやすく、一旦形成されると増幅傾向が高いことを示している。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可能性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 (recPrP) の精製

マウス、ハムスターの full PrP 配列 (23-231) の発現ベクターを作製し、大腸菌 (pET vector) 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 recPrP

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、recPrP 溶液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。recPrP の濃度は 60-120 μ g/ml の範囲で最適条件を検討した。RT-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 recPrP (recMoPrP) とハムスター配列 recPrP (recHaPrP) 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。さらにそれらの性質が以降も維持されるかどうか Round5 まで RT-QUIC 反応を行った。

(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 recMoPrP、recHaPrP へのシード活性の顕著な違い

recMoPrP、recHaPrP 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 recMoPrP、recHaPrP 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 Round1 とし、その反応液の希釈液の一部を次の反応 (Round2) のシードとして RT-QUIC 法を実施) したところ、Round2 においても recHaPrP は C-BSE 由来の recMoPrP 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 recMoPrP フィブリルや recHaPrP フィブリルでは rMoPrP、rHaPrP の両者に高い反応を示した (図 1)。

2) C-BSE、L-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代反応

C-BSE、L-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代を継続したところ、Round2 においても recHaPrP は C-BSE 由来の recMoPrP フィブリル (2nd-rMoPrP-fib^{C-BSE} と表す) に対して反応を示さなかった (図 2)。それに対して L-BSE 由来の recMoPrP フィブリルや recHaPrP フィブリルでは rMoPrP、recHaPrP の両者に高い反応を示した。その後も recMoPrP を基質として RT-QUIC 法で継代反応を続けると、Round4 で 0.5%シード量で 1/4、Round5 では 0.5%シード量で 4/4、0.05%でも 3/4 の

recHaPrP を添加したウェルが反応を示した (図 2)。いったん陽性となった反応液をシードとした場合は recMoPrP、recHaPrP の両者に対して反応性を示した。

D. 考察

研究結果で示したような Round 2 まで含めた recMoPrP と recHaPrP 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 Round1 においてたまたま recHaPrP にシード活性を示さず、recMoPrP にのみ陽性だったとしても Round 2 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。

一方、最近アメリカの RML (Rocky Mountain Laboratories) のグループが種々の recPrP (Bank vole や Sheep) を用いた RT-QUIC 法において Round1 の反応性の違いから L-BSE と C-BSE、H-BSE を鑑別可能であることを報告している。ただしサンプルのシード活性が低い場合 Round1 のみにおける反応で判断する場合には非常に判断が難しい場合もありうる想定され、そのような際には今回のような Round2 における反応性の違いがより有用であると考えられる。

また興味深いことに fourth round 以降は recMoPrP、recHaPrP の両者に反応するフィブリルが生成された。RT-QUIC 法では非特異的な recPrP フィブリルが生成しやすいことを我々は観察しており (*J Virol* 88(20), 11791-801, 2014)、今回も round 数を重ねることにより非特異的な recPrP フィブリルが多数派となり、recMoPrP と recHaPrP の両方に反応するようになったのではないかと考えている。

E. 結論

RT-QUIC 法は定型 BSE である C-BSE、非定型 BSE である L-BSE の高感度検出アッセイとなりうることが示された。また recHaPrP は L-BSE には recMoPrP と遜色ないレベルで反応するのに対して C-BSE に対して全く反応しなかった。この性質は recMoPrP を基質とした RT-QUIC 法で継代することにより Round3 まで維持された。この性質を応用した RT-QUIC 法により C-BSE と L-BSE が原理的に鑑別可能である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fuchigami T, Yamashita Y, Kawasaki M, Ogawa A, Haratake M, Atarashi R, Sano K, Nakagaki T, Ubagai K, Ono M, Yoshida S, Nishida N, Nakayama M. Characterisation of radioiodinated flavonoid derivatives for SPECT imaging of cerebral prion deposits. *Sci Rep.* 5: 18440, 2015
 - 2) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Takatsuki H, Atarashi R, Nishida N. Strain-Dependent Effect of Macroautophagy on Abnormally Folded Prion Protein Degradation in Infected Neuronal Cells. *PLoS One.* 10: e0137958, 2015
 - 3) Sano K, Atarashi R, Nishida N. Structural conservation of prion strain specificities in recombinant prion protein in real-time quaking-induced conversion. *Prion.* 9: 237-243, 2015
 - 4) Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R, Nishida N. Rapid and Quantative Assay of Amyloid-Seeding Activity in Human Brains Affected with Prion Diseases. *PLoS One.* 10: e0126930, 2015
 - 5) Honam T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Mori T, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Ubiquitin-specific protease 14 modulates degradation of cellular prion protein. *Sci Rep.* 5: 11028, 2015
- 2.学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし