

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Hasebe, R., Suzuki, A., Yamasaki, T., and Horiuchi, M. Increased membrane permeability by complement factors affect PrP^{Sc} deposition in neurons . Prion2015 (May, 26-29, 2015, Fort Collins, Colorado, USA)
- 2) Kuroda, M., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Analysis of activation state of astrocytes with the progression of prion diseases. Prion2015 (May, 26-29, 2015, Fort Collins, Colorado, USA)
- 3) Shan, Z., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and 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 (May, 26-29, 2015, Fort Collins, Colorado, USA)
- 4) Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Flow cytometric detection of PrP^{Sc} in neurons from prion-infected mouse brain. Prion2015 (May, 26-29, 2015, Fort Collins, Colorado, USA)
- 4) Tanaka, M., Masujin, K., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Comparison of PrP^{Sc}-specific staining with two anti-PrP monoclonal antibodies in immuno-cytochemistry. APPS2015 (September, 4-5, 2015, Kanazawa, Ishikawa, Japan)
- 5) Tanaka, M., Masujin, K., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Comparison of PrP^{Sc}-specific staining with two anti-PrP monoclonal antibodies 132 and 8D5 in immuno-cytochemistry. The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology (November, 22-24, 2015, Fukuoka, Japan)

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

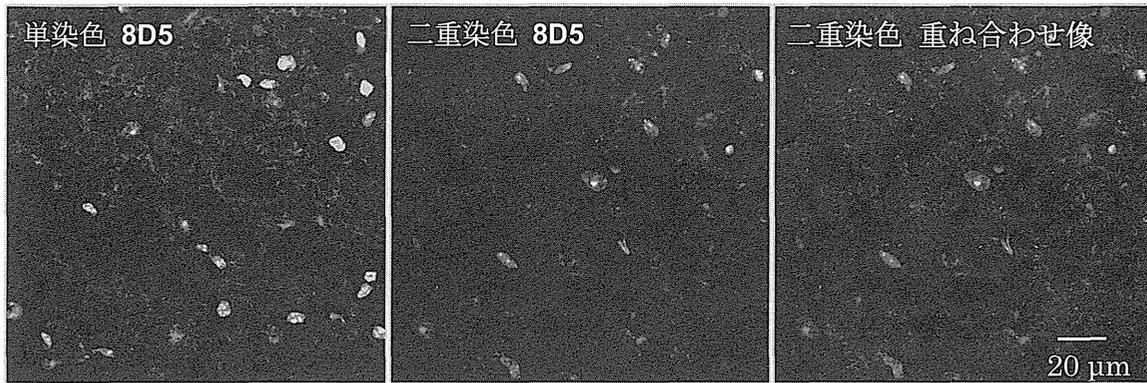
I. 参考文献

- 1) Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hills, B., Groschup, M. H. Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev. Vet. Med.*, 102: 112-117. 2011.
- 2) Biacabe, A.G., Laplanche, J.L., Ryder, S., Baron, T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.*, 5: 110-115. 2004.
- 3) Casalone, C., Zunusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., Caramelli, M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy. Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 3065-3070. 2004.
- 4) Dudas, S., Yang, J., Graham, C., Czub, M., McAllister, T.A., Coulthart, M.B., Czub, S. Molecular, biochemical and genetic characteristics of BSE in Canada. *PLoS One.*, 5: e10638. 2010.
- 5) Fukuda, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Shimizu, Y., Matsuura, Y., Shu, Y., Kurachi, M., Kasai, K., Murayama, Y., Onoe, S., Hagiwara, K., Sata, T., Mohri, S., Yokoyama, T., Okada, H. *Microbiol. Immunol.*, 53: 704-707. 2009.
- 6) Fukuda, S., Onoe, S., Nikaido, S., Fujii, K., Kageyama, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Yoshioka, M., Maruyama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T., Okada, H. Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in dxperimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 37-44, 2012.
- 7) Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Sato, Y., Nakamura, Y., Tobiume, M., Shinagawa, M., Sata, T. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrP^{Sc} in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60: 306-308. 2007.
- 8) Kim, C.L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Horiuchi, M. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology.*, 320: 40-51. 2004.
- 9) Masujin, K., Kaku-Ushiki, Y., Miwa, R., Okada,

- H., Shimizu, Y., Kasai, K., Matsuura, Y., Yokoyama, T. The N-terminal sequence of prion protein consists an epitope specific to the abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}). *PLoS One.*, 2013. 8: e58013.
- 10) Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drogemuller, C., Zurbriggen, A., Seuberlich, T. Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog.*, 3: e82, 2007.
 - 11) Porcario, C., Hall, S.M., Martucci, F., Corona, C., Inlini, B., Perazzini, A.Z., Acutis, P., Hamir, A.N., Loiacono, C.M., Greenlee, J.J., Richt, J.A., Caramelli, M., Casalone, C. Evaluation of two sets of immunohistochemical and western blot confirmatory methods in the detection of typical and atypical BSE cases. *BMC Res. Notes.*, 4: 376, 2011.
 - 12) Sakai, K., Hasebe, R., Takahashi, Y., Song, C.H., 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.
 - 13) Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Nohtomi, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., Higuchi, Y., Sato, Y., Sata, T. Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56: 221-222, 2003.
 - 14) Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R., 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.

図表

(A)



(B)

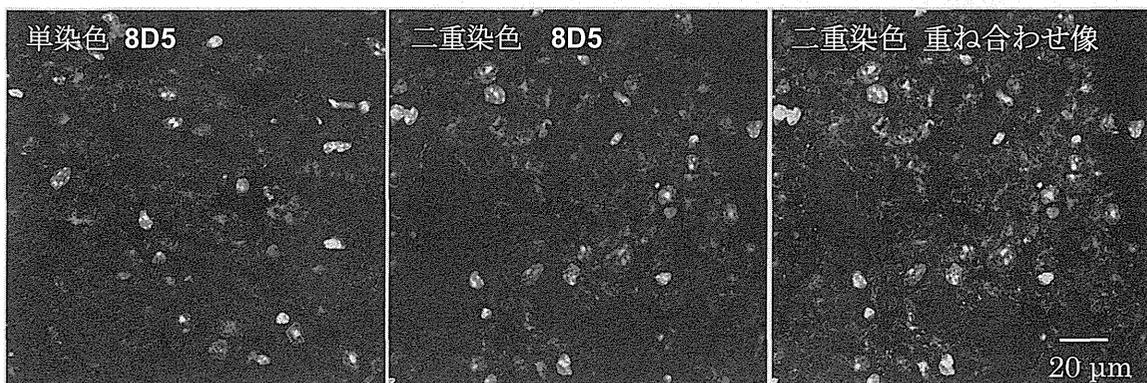


図 1. mAb 132 と mAb 8D5 による二重免疫染色の条件検討。(A) 条件①での染色像。(B) 条件②での染色像。赤は mAb 8D5、緑は mAb 132、青は DAPI により染色された核を示す。

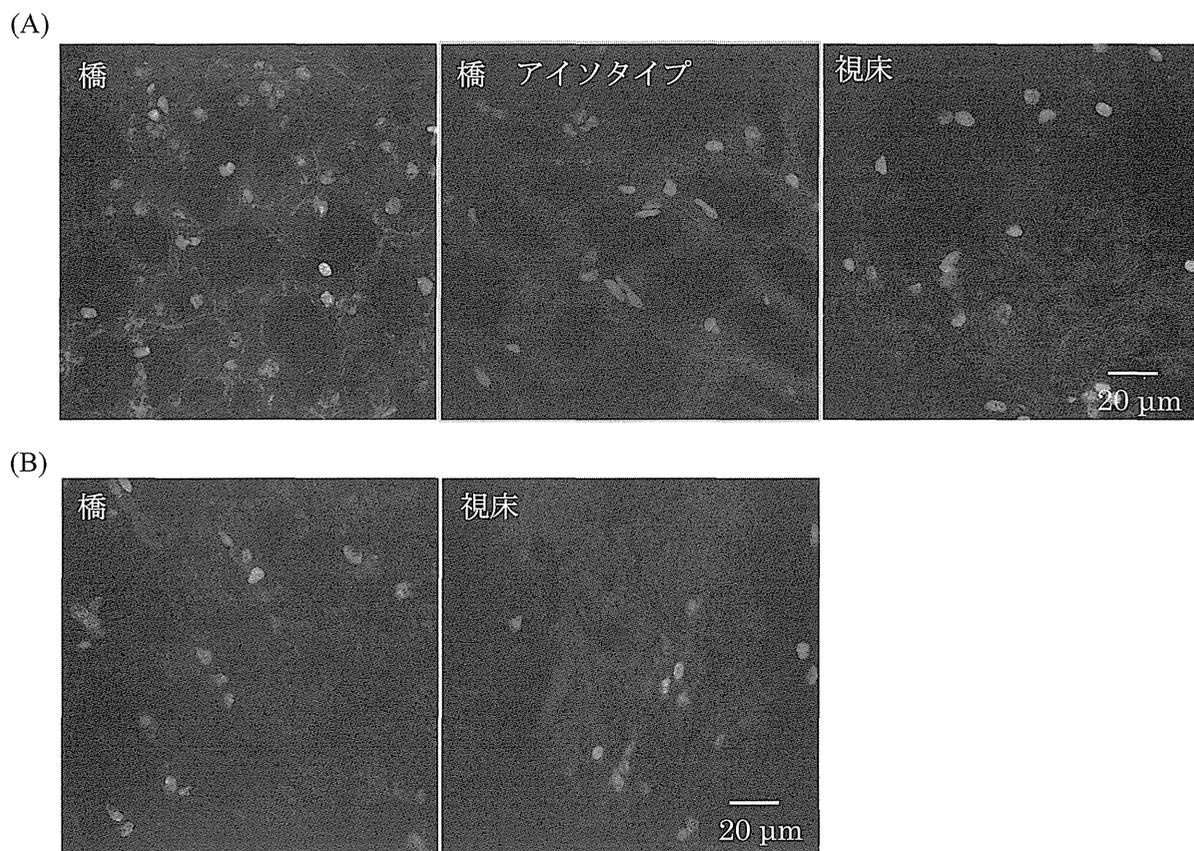


図 2. mAb 132 と mAb 8D5 の二重染色による L-BSE 感染牛脳組織の PrP^{Sc} の検出。(A) No. 6981 の橋および視床における染色像。(B) No. 7018 の橋および視床における染色像。赤は mAb 8D5、緑は mAb 132、青は DAPI により染色された核を示す。

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

分担研究者 福田 茂夫 道総研 畜産試験場 基盤研究部 生物工学グループ 研究主任

研究協力者 岡田 洋之 農研機構 動物衛生研究所 インフルエンザプリオン病研究チーム

研究要旨

脳内接種による非定型 BSE 感染実験により、非定型 BSE の PrP^{Sc} の脳内出現部位および経時的な蓄積量の変化を明らかにする。また非定型 BSE の PrP^{Sc} が、物理・化学的処理によって受ける影響を明らかにし、BSE の発生機序に関する知見を得る。本年度は、脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染牛の未発症期での脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量の変化をウエスタンブロット (WB) 法を用いて解析した。接種後 7.5 ヶ月および接種後 9.1 ヶ月の牛では、脳幹部の他、小脳、視床に PrP^{Sc} が検出され、接種後 9.1 ヶ月の牛では脊髄腰膨大部でも PrP^{Sc} が検出された。接種後 1.7 ヶ月および接種後 4.2 ヶ月の牛では明瞭な PrP^{Sc} はみられなかった

A. 研究目的

1986 年に英国で初めて確認された牛海綿状脳症 (BSE) は、1 種類のプリオン株 (定型 BSE) によると考えられてきたが、2003 年からこれまでに 90 例以上の非定型 BSE (L 型および H 型) と呼ばれる異なるプリオン株による BSE が日本を含む多くの国で散発的に確認されている。非定型 BSE 患畜は、ほとんどが 8 歳以上の高齢牛で、定型 BSE の発生状況との関連性が低いことから、孤発性 (自然発生的) であることが示唆される。道総研畜産試験場では、これまでに脳内接種による定型または非定型 L 型 BSE の牛への感染試験を実施し、定型 BSE では、臨床症状と発症時期、異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の出現部位を明らかにした。また、非定型 L 型 BSE は、臨床症状の出現時期が定型 BSE よりも早いことから、そのプリオンは牛に対して病原性が強いことが示唆された。しかし、非定型 BSE の発生機序は不明であり、BSE 対策の残された問題として、消費者から原因究明を要望する声が挙がっていることから、非定型 BSE 感染牛を用いた試験研究による知見の集積が必要である。

本研究では牛への脳内接種による非定型 BSE 感染実験により、非定型 BSE の PrP^{Sc} の脳内出現部位および経時的な蓄積量の変化を明らかにする。また非定型 BSE の PrP^{Sc} が、物理・化学的処理によって受ける影響を明らかにし、BSE の発生機序に関する知見を得る。

本年度は、脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染牛の未発症期での脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量の変化をウエスタンブロット (WB) 法を用いて解析した。また非定型 BSE 感染脳中の PrP^{Sc} が、加熱処理によって定型 BSE ヘプリオン性状が変化する可能性を検討した。

B. 研究方法

1) 非定型 BSE 感染牛の PrP^{Sc} の脳内出現部位と経時的蓄積量

ホルスタイン種子牛 4 頭に非定型 BSE (L 型) 感染牛の 10%脳乳剤 1ml を脳内接種した。術後は BSE 隔離牛舎にて飼養し、経過観察を行った。

それぞれ 1.7~9.1 ヶ月間の経過観察を行った後、病理解剖し脳を採取した。脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量をウエスタンブロット (WB) 法を用いて解析した。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

非定型 L 型 BSE 感染脳を PBS 中でビーズ破碎し、乳剤を作製した。乳剤を 70°C から 150°C で加熱処理した後、定型 BSE プリオンを増幅する PMCA 法を実施し、WB 法で定型 BSE プリオンの検出を試みた。

(倫理面への配慮)

サンプル採取および分析は、研究従事者の危険

排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) 非定型 BSE 感染牛の PrP^{Sc} の脳内出現部位と経時的蓄積量

No.2809 (接種後 9.1 ヶ月) および No.1013 (接種後 7.5 ヶ月) では、脳幹部の他、小脳、視床に PrP^{Sc} が検出され、No.2809 では脊髄腰膨大部でも PrP^{Sc} が検出された。No.5904 (接種後 4.2 ヶ月)、No.5957 (接種後 1.7 ヶ月) では明瞭な PrP^{Sc} はみられなかった (図 1)。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

加熱処理した非定型 L 型 BSE 感染脳を用い、定型 BSE の PMCA 法により PrP^{Sc} 増幅を試みたが、定型 BSE の PrP^{Sc} は検出されなかった (図 2)

D. 考察

脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染牛では臨床症状が接種後 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 7 ヶ月前では PrP^{Sc} の検出が困難な場合があることが示唆された。

E. 結論

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、約 7 ヶ月前では PrP^{Sc} の検出が困難な場合があると示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 福田 茂夫 道総研畜産試験場における非定型 BSE に関する研究 (研究紹介) 北海道獣医師会雑誌 59: 260-265, 2015

2. 学会発表

1) Fukuda, F., Fujii, T., Naito, A., Kageyama, S., Moriyasu, S., Okada H. Objective evaluation for clinical signs of BSE using biological information. Asian Pacific Prion Symposium 2015 (Sept, 4-5, 2015, Kanazawa, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

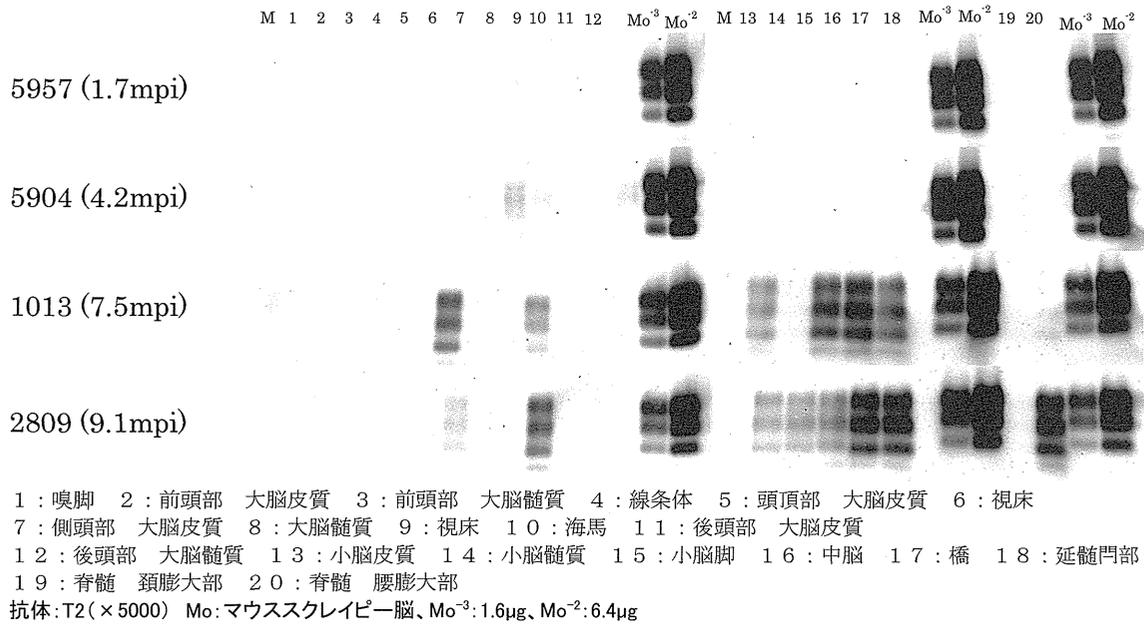


図1 未発症期に解剖した非定型L型BSE感染牛の脳および脊髄のWB法によるPrP^{Sc}解析

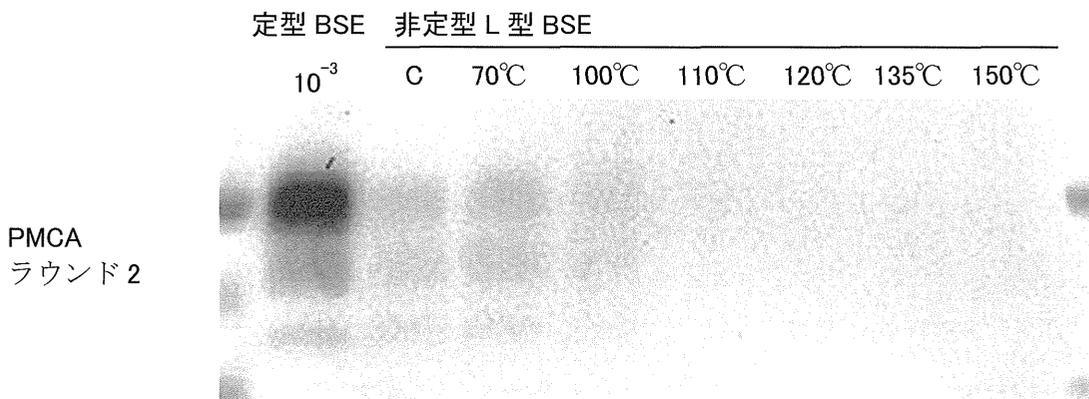


図2 加熱処理した非定型L型BSE感染脳を定型BSEのPMCA法によりPrP^{Sc}増幅

8. 非定型 BSE および CWD プリオンの生物学的性状解析

分担研究者 室井 喜景 帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門 准教授

研究要旨 非定型 BSE の一種である L 型 BSE の性状の一端を解析すること、および腹腔内接種による伝播経路を検討することを目的として、異なる接種経路における L 型 BSE 感染ハムスターでの PrP^{res} の全身分布を病理学的に解析した。L 型 BSE 由来ハムスター馴化株 (LBSE) と Scrapie 由来 263K ハムスター馴化株 (263K) の脳乳剤を、ハムスターの脳内 (10%, 20 μ l, IC 群), あるいは腹腔内 (1%, 200 μ l, IP 群) に接種し、病理学的検索を実施した。263K-IC 群と IP 群では、軽度の臨床症状を示した個体では大脳, 海馬, 小脳皮質への沈着が見られなかったのに対して、重度の個体では間脳を中心に脳全体へ PrP^{res} 沈着がみられた。一方, LBSE-IC 群と IP 群では軽度の個体では間脳への沈着がみられなかったが、重度の個体では大脳および海馬を中心に小脳皮質を除く脳全体に沈着が認められた。また、脊髄では、263K と LBSE において軽度の個体では中心管周囲の灰白質に軽度な沈着が認められ、重度の個体では灰白質全体に沈着が拡がった。脊髄への沈着の程度は、263K に比べ LBSE では軽度だった。全身臓器においては、263K 接種群では接種経路に関わらず脾臓, 副腎, 消化管神経叢, 腸管関連リンパ装置 (GALT) において沈着が認められたが、LBSE 接種群では接種経路に関わらず末梢への沈着は認められなかった。中枢神経において PrP^{res} 沈着が顕著となる領域はプリオン株ごとに共通しており、脳での病変形成には PrP^{res} と感染領域との親和性が関与することが示唆された。また、脳における PrP^{res} 沈着の拡がり方から、接種経路に関わらず共通する脳への伝播経路の存在が示唆された。また、全身臓器の検索より、263K では IC 群と IP 群のいずれにおいても末梢組織への沈着がみられたことから、PrP^{res} が末梢神経または血液を介して脳から末梢へ伝播することが示唆された。一方、LBSE では接種経路に関わらず末梢組織への沈着が認められず、脳から末梢組織への遠心性の伝播と、末梢神経やリンパ組織を介した脳への伝播については確認できなかった。

A. 研究目的

TSE に関する動物実験では潜伏期間の短縮や感染率を高めるために、プリオンの脳内接種が多く行われる。また、プリオン病の病態の再現や解析を実施するために、経口あるいは腹腔内接種による末梢を介した感染実験が行われている。しかしながら、プリオンの末梢からの侵入門戸および末梢から CNS への伝播経路にはいまだ不明な点が多い。

Scrapie ではプリオンの侵入門戸として腸管関連リンパ組織 (GALT) が重要であると考えられている。BSE でも、Scrapie と同様に、消化管から自律神経に侵入し、交感神経あるいは副交感神経を介して神経上行性に脳へ達するとされている。げっ歯類を用いた研究によっても、末梢神経に沿って神経上行性あるいは下行性に拡がるという PrP^{res} の特徴が報告されており、腹腔接種後には脾臓から侵入した PrP^{res} が交感神経系を介して CNS へ達し、胃内接種後にはパイエル板から消化管神経叢を介して CNS へ達するという経路が示唆されている。また、いくつかの経時的研究においても、同様に PrP^{res} が神経終末から CNS へ拡がること

示唆されており、経口的に摂取された PrP^{res} は、消化管神経叢から交感神経を經由して脊髄に達する経路、消化管神経叢から迷走神経を經由して延髄に達する経路により CNS へ達することが示されている。

神経路による伝播が一般的に考えられている一方で、PrP^{res} の伝達経路として血行性経路の関与も示唆されている。感染動物の血液中に PrP^{res} の存在が確認されたことから、脾臓やリンパ節へのプリオンの蓄積には血液を介した伝播が関与していることが示唆されている。さらに、脾臓やリンパ節などのリンパ網内系で増幅した PrP^{res} が末梢から脳へ伝達される過程においても、血行性伝播の関与が考えられている。ヒツジへの TSE 感染実験において、投与経路やプリオン株に関わらず、脳室周囲器官への沈着が感染初期から常に確認されていることから、末梢神経を介した伝播に加え、血中の PrP^{res} が脳室周囲器官から CNS に侵入している可能性が示唆されている。

一方、全身の PrP^{res} 分布についても様々な研究が行われている。ヒツジの Scrapie 野外例では、CNS とともに、消化管神経叢、リンパ系組織、副腎、

末梢神経などに PrP^{res} が沈着する。ウシの BSE については、野外例で消化管神経叢、副腎、末梢神経への沈着が確認されているが、GALT などのリンパ系組織では検出されなかった。BSE 感染脳をウシに経口摂取させた研究でも消化管神経叢への沈着がみられたが、野外例とは異なり GALT にも限局して PrP^{res} 沈着がみられ、プリオンの摂取量が影響すると考えられている。これまでの我々の研究では、マウスに BSE 感染脳を経口摂取させた研究では、ウシへの経口感染とは異なり、消化管神経叢への PrP^{res} 沈着はみられず、動物種による差が認められた。さらに、モルモットへの BSE 感染実験では、腹腔内接種したモルモットでは消化管神経叢およびリンパ組織で PrP^{res} が検出されたのに対し、脳内接種したモルモットでは腹腔内接種と異なり、消化管神経叢とリンパ組織のいずれでも検出されなかった。このように、PrP^{res} の全身分布にはプリオン株や摂取量、動物種、感染経路が関与している可能性が考えられる。

今回、Scrapie ハムスター馴化株であり生物学的性状が安定している 263K 株をコントロールとし、263K および L 型 BSE を用いてハムスターの脳内接種あるいは腹腔内接種による感染実験を行った。腹腔内接種による L 型 BSE のハムスターへの伝達はいまだ報告がなく、腹腔内接種による脳および全身の病態は不明である。L 型 BSE の生物学的性状の一端を評価することを目的として、異なる接種経路における L 型 BSE 感染ハムスターでの PrP^{res} の全身分布を比較病理学的、経時的に検討するとともに、PrP^{res} の体内伝播様式について検討した。

B. 研究方法

1) 供試動物、投与材料

プリオン接種動物および未接種陰性対照として、シリアンハムスター (4~5 週齢、雌、日本 SLC 株式会社、Slc: Syrian) を使用した。実験動物への投与材料は、日本で発生した L 型 BSE 感染牛 (BSE/JP24) (LBSE) の脳を用いて作成した 2.0%あるいは 20%脳乳剤入りリン酸緩衝液 (PBS)、ヒツジ由来 Scrapie ハムスター純化株である 263K 感染ハムスターの脳を用いて作成された 2%あるいは 20%脳乳剤入り PBS を使用した。接種量は、脳内接種では 20%脳乳剤入り PBS100 μ l、腹腔内接種では 2%脳乳剤入り PBS100 μ l を接種した。

2) 解剖及び採材

解剖は過去の実験で末期症状を呈した日数をもとに、263K-IC 群では接種後 60 日から、263K-IP 群では接種後 70 日から解剖を実施し、LBSE-IC 群では接種後 110 日から解剖を実施した。

脳、脊髄、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、副腎、膵臓、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、骨格筋 (前肢、後肢、内腸腰筋、胸最長筋、腰最長筋) を病理学的解析のために採材した。

3) 組織学的検索及び免疫組織学的検索

採材した臓器は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、切り出し、再固定を行った。次に、98%ギ酸中で 1 時間振盪し、PrP^{res} の感染性を消失させた。その後、脱水、パラフィン包埋を実施し、パラフィン切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

免疫組織学的検索では、一次抗体として抗 PrP^{res} ウサギポリクローナル抗体である B103 抗体を 250 倍に希釈し、二次抗体には HRP 標識抗体 (Dako, EnvisionKit, DAKO, U.S.A.) を用いた。また、PrP^{res} の免疫活性の賦活化には 135WHA 法を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 臨床症状および肉眼所見

263K 接種群において、IC 群では接種後 60、70 日 (dpi) の剖検時には臨床症状を示さず、80~100dpi では沈鬱、ふらつき、体重減少などの症状がみられた。IP 群では 70、80dpi の時点では臨床症状が見られず、90~110dpi では IC 群と同様の臨床症状が認められた。LBSE 接種群においては、IC 群で 170dpi から沈鬱、体重減少などの症状が認められた。IP 群については、最も早いもので 310dpi から沈鬱、体重減少などの症状がみられ、最も長いものでは 420dpi から同様の臨床症状が認められた。いずれの動物においても、剖検時には肉眼的に脳外観および矢状断に著変はみられなかった。また、そのほかの臓器でも著変はみられなかった。

2. 組織学的検索および免疫組織学的検索

263K-IC 群では、60、70dpi (No. 1, 2) の脳では間脳、中脳、延髄にのみ軽度~中等度の空胞形成が認められたが、80~100dpi (No. 3, 4, 5) では大脳、間脳、中脳、小脳髄質、延髄における重度の空胞形成が認められた。抗 PrP^{res} 抗体に対する IHC では No. 1, 2 では間脳、中脳、小脳髄質、延髄において同様の沈着が認められたが、大脳、海馬、小脳皮質への沈着はみられなかった。しかし、No. 3, 4, 5 では大脳、海馬、延髄を含む脳全体において PrP^{res} のび慢性沈着が認められた。IP 群においては、70、80dpi (No. 1, 2) では間脳、中脳、延髄

のみで空胞形成が認められたが、臨床症状を示した 90, 95dpi (No. 3, 4) では大脳皮質あるいは小脳皮質を除く広い範囲に空胞形成が認められた。IHC では、No. 1 では大脳、小脳皮質への沈着が認められなかった。しかし、No. 3, 4 では脳全体、No. 2 では小脳皮質を除く広範囲に PrP^{res} 沈着が認められた。IC 群、IP 群のいずれにおいても、全ての個体において間脳への沈着が最も顕著だった (表 1, 図 1)。

一方、LBSE-IC 群では、110, 130dpi (No. 1, 2) では海馬のみに軽度の空胞形成が見られたが、150, 170dpi (No. 3, 4) の大脳、海馬、間脳、中脳、小脳皮質、延髄で空胞形成が認められた。IHC では No. 1 の大脳、海馬、中脳、小脳皮質、延髄に PrP^{res} 沈着が認められたが、間脳への沈着は見られなかった。しかし、No. 2, 3, 4 では小脳皮質を除くすべての部位に PrP^{res} 沈着が認められ、特に海馬および大脳で重度の沈着が認められた。IP 群においても、臨床症状を示さなかった 350dpi (No. 2) でも小脳皮質を除く広い範囲に軽度の空胞形成がみられ、重度の臨床症状を示した 310dpi および 370dpi (No. 1, 5) では大脳、海馬を中心として重度の空胞形成が認められた。IHC においては、No. 2 では大脳以外の沈着は軽度であったが、No. 1, 5 では小脳皮質を除いて重度の PrP^{res} 沈着が認められた。PrP^{res} 沈着は微細顆粒状および大脳皮質軟膜下に顕著に認められ、放射状沈着は認められなかった。いずれの群においても、全ての日数において海馬及び大脳への沈着が最も顕著であった。なお、LBSE-IP 群では 7 匹中 3 匹が臨床症状を示さず、そのうち 2 匹 (No. 4, 6) では IHC により脳で PrP^{res} が検出されなかった (表 2, 図 2)。感染が確認された 263K 接種群および LBSE 接種群のいずれの個体においても、第 3 脳室周囲への PrP^{res} 沈着が多く認められ、脈絡叢を有する脳室を裏打ちする上皮細胞およびその隣接部位において PrP^{res} 沈着が強く認められる傾向がみられた (図 3)。

脊髄でも 263K 接種群のすべての個体において空胞形成が認められた。IHC では、脳への PrP^{res} 沈着が軽度であった個体では中心管周囲の灰白質に軽度な沈着が認められ、脳への沈着が顕著であった個体では灰白質全体に重度の沈着が認められた。LBSE 接種群においても中心管周囲に同様の結果が認められたが、空胞形成および PrP^{res} 沈着の程度は 263K 接種群よりも明らかに軽度であった (図 4)。

全身臓器の検索では、263K 接種群において、脾臓 (IC 群: 2/5 頭, IP 群: 4/4 頭)、副腎 (IC 群: 4/5 頭, IP 群: 2/4 頭)、消化管神経叢 (IC 群: 4/5 頭, IP 群: 4/4 頭) (図 5)、GALT (IC 群: 5/5 頭, IP 群: 2/4 頭) で PrP^{res} 沈着が確認されたが、末梢神経を

含むその他の臓器では沈着は認められなかった。一方で、LBSE 接種群では、消化管神経叢を含むいずれの臓器にも PrP^{res} 沈着は認められなかった (図 6)。各群の末梢における PrP^{res} 分布については表 3 にまとめた。なお、骨格筋における免疫染色では、非特異反応が頻繁に発現するため、判定不可能であった。

D. 考察

非定型 BSE の起源はいまだ明らかではなく、その生物学的性状の評価を行うために実験動物への伝達実験が数多く行われている。本邦で発見された LBSE のハムスターへの伝達は脳内接種によって可能であることが確認されている。ハムスターの脳における PrP^{res} 沈着は定型 BSE で認められる放射状の PrP^{res} 沈着が認められず、微細顆粒状沈着と大脳皮質軟膜下への顕著な沈着が特徴的であった。今回、日本で発生した LBSE (BSE/JP24) をハムスターの脳内および腹腔内に接種した結果、両群で異なる潜伏期間を示した後に沈鬱や消瘦を呈し、脳内への PrP^{res} 沈着が確認された。腹腔内接種によるハムスターへの伝達はこれまで報告がなく、これにより末梢からの感染による病態の解析が可能となった。

263K 接種群と LBSE 接種群で脳への PrP^{res} 沈着を比較した結果、263K 接種群では IC と IP 接種群の全ての個体で間脳への PrP^{res} 沈着が最も顕著であった。LBSE 接種群では IC, IP 接種群に関わらず全ての個体で海馬および大脳への沈着が最も顕著であり、腹腔内接種により認められた脳への PrP^{res} 沈着は、病変とその分布、沈着様式が過去に報告された脳内接種によるものと一致していた。結論として、病末期の脳病変はそれぞれの株において接種経路による違いは認められないことが明らかとなった。263K は間脳、LBSE は海馬および大脳と PrP^{res} との親和性が強いと考えられ、脳における PrP^{res} の分布には接種経路よりもプリオン株と感染部位との親和性が強く関与していることが示唆された。

それぞれの接種経路において脳での PrP^{res} の拡がり方を比較した。本実験では IC と IP による脳での PrP^{res} の拡がり方から、IC と IP のどちらにも共通する CNS への伝播経路が存在する可能性が示唆された。神経を介した PrP^{res} の伝播が重要視される一方で、接種経路に関わらない伝播経路として血液の関与が示唆されている。ハムスターへの Scrapie139A 株投与実験により、プリオン感染直後、ウイルス血症 “viraemia” と類似する病態 “Prionemia” となることが確認されていることから、プリオン病の病理発生に血液中の PrP^{res} の関与が示唆されている。CNS への感染成立についても血中の PrP^{res} の関与が疑われ、最近の研究では、

接種経路やプリオン株に関わらず、プリオンを接種されたすべてのヒツジの脳室周囲器官において早期から PrP^{res} の蓄積が認められたことから、脳室周囲器官から血中の PrP^{res} が脳へ侵入する血行性伝播の可能性が示唆されている。本研究でも、脈絡叢が認められる第3脳室周囲において強い沈着が認められた。脳室周囲器官のうち、脳弓下器官は第3脳室前壁に、終板器官は第3脳室腹側面に位置しており、強い沈着が認められた部位はこれら脳室周囲器官に隣接する領域である可能性が考えられた。また、接種経路に関わらず脳での拡がり方に差が見られなかったことから、共通する脳への伝播経路の存在が疑われ、血行性伝播の関与が考えられた。

本実験では、263K 接種群および LBSE 接種群のいずれにおいても脊髄病変が類似していた。いずれのプリオン株でも、接種経路に関わらず脳への PrP^{res} 沈着が軽度な個体では脊髄の中心管周囲において軽度の沈着が認められ、脳への沈着が重度の個体では灰白質全体への沈着が認められた。脊髄中心管の内腔は脳室上衣で裏打ちされ、その内部は血漿から作られた脳脊髄液で満たされている。今回、脊髄において中心管周囲から PrP^{res} の沈着が拡がる像が認められたことから、血液中の PrP^{res} が脊髄での病変形成にも関与している可能性が考えられた。

全身臓器への分布については、263K 接種群において接種経路に関わらず消化管神経叢や GALT を含む末梢組織への沈着がみられた。今回、IC 群で認められた末梢における PrP^{res} は、脳で増幅した PrP^{res} が末梢神経を介した遠心性の伝播あるいは血行性の伝播によって沈着したことが考えられる。また、IP 群で認められた PrP^{res} 沈着は IC と同様に CNS から伝播された可能性が考えられると同時に、脾臓および消化管神経叢は全ての個体で沈着がみられたことから PrP^{res} の取り込み部位である可能性が考えられる。Scrapie の野外例では、2 か月齢のヒツジにおいて回腸パイエル板および腸間膜リンパ節への PrP^{res} 沈着が認められたことから、プリオンの侵入門戸として GALT が重要であると考えられている。本実験では、CNS よりも先に PrP^{res} が沈着している末梢組織を確認することができず、末梢におけるプリオンの取り込み部位については特定することはできなかった。一方、LBSE 接種群における PrP^{res} の全身分布については、IC 群および IP 群のいずれにおいても末梢への沈着が認められなかった。LBSE の全身分布についての研究では、ウシへの脳内接種実験においてウエスタンプロット法により一部の末梢神経系で PrP^{res} が検出されているが、脾臓を含むリンパ組織では検出されなかった。これらの結果および本実験の IC 群より、LBSE では脳内接種によ

って脳内で増幅した PrP^{res} が末梢のリンパ組織へ伝播されない、あるいはリンパ組織との親和性が低いことが考えられる。また、今回の実験では IP 群においても脾臓や消化管神経叢を含めた末梢への沈着がみられず、末梢神経やリンパ組織を介した脳への伝播が確認できなかった。

本研究より、脳での病変形成には、接種経路よりも PrP^{res} と感染領域との親和性が関与し、その親和性は株によって異なることが示唆された。さらに、263K では脳内で増幅した PrP^{res} が内臓神経や迷走神経といった末梢神経を介した遠心性の伝播、および血液や脳脊髄液を介した伝播を生じる可能性が示唆された。一方、LBSE では脳内で増幅した PrP^{res} が神経性あるいは血行性に脊髄へ伝播することは示唆されたが、末梢神経や血液を介した末梢組織への遠心性伝播は確認されなかった。また、LBSE-IP では末梢組織への沈着なしに脳への伝播が認められたことから、本実験では IP における脳への伝播経路を特定することはできなかった。加えて、LBSE の末梢神経、他臓器への親和性を欠くことは起源を考える上で重要と思われる。末梢との親和性が低いということは、BSE や Scrapie で推測されているように経口から摂取された PrP^{res} による消化管内からの感染が成立しにくい可能性があり、LBSE が感染性でなく孤発性であるという説を支持するようにも考えられる。しかし、末梢神経やリンパ組織から侵入した PrP^{res} がそこで増幅せずに脳へ伝播されている可能性も否定できず、LBSE の起源および伝播経路の特定にはさらなる検討が必要である。

E. 結論

プリオン感染による脳での病変形成には、接種経路よりも PrP^{res} と感染領域との親和性が関与し、その親和性は株によって異なることが示唆された。LBSE では脳内で増幅した PrP^{res} が神経性あるいは血行性に脊髄へ伝播することは示唆されたが、末梢神経や血液を介した末梢組織への遠心性伝播は確認されなかった。LBSE の末梢神経、他臓器への親和性を欠くことは起源を考える上で重要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 榎芙蓉, 木元美樹, 室井喜景, 堀内基広, 古岡秀文, BSE および L 型 BSE の異種間交差伝

達実験によるプリオン株の病理学的特徴への種差の影響に関する検討. 第 158 回日本獣医学会 (2015.9.7-9, 北里大)

- 2) 木元美樹, 室井喜景, 堀内基広, 古岡秀文, Scrapie および L 型 BSE 感染ハムスターを用いた接種経路による病変分布の経時的比較. 第 158 回日本獣医学会 (2015.9.7-9, 北里大)

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

表 1. 263K の免疫染色結果

	IC				IP			
	60dpi	70dpi	80dpi	90dpi	70dpi	80dpi	90dpi	95dpi
大脳	-	+	+	+	-	+	+	+
海馬	-	+	+	++	-	+	+	++
間脳	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
中脳	+	+	++	++	+	++	++	++
小脳 皮質	-	-	+	+	-	-	+	+
小脳 髓質	+	++	++	++	+	++	++	++
延髄	+	++	++	++	+	++	++	++

表 2. LBSE の免疫染色結果

	IC				IP			
	110dpi	130dpi	150dpi	170dpi	310dpi	315dpi	370dpi	420dpi
大脳皮質	+	++	+++	+++	+++	++	+++	+
海馬	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
視床	-	+	++	++	++	+	++	-
中脳	+	+	+	++	+	+	+	++
小脳 皮質	-	-	-	-	-	-	-	-
小脳 髓質	+	+	+	++	++	+	++	+
延髄	+	+	+	++	+++	+	+++	++

表 3. 末梢組織におけるプリオン沈着

	263K		LBSE	
	IC	IP	IC	IP
GALT	+	+	-	-
Enteric Plexus	+	+	-	-
Spleen	+	+	-	-
Adrenal gland	+	+	-	-

図 1. 263K のプリオン分布

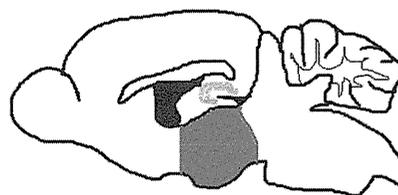
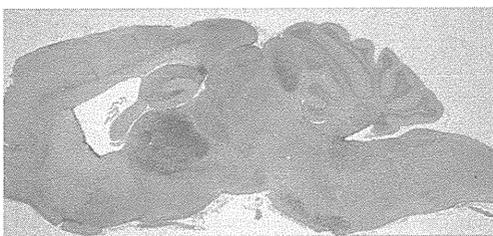


図 2. LBSE のプリオン分布

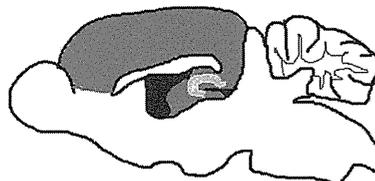


図 3. LBSE(IC) 110dpi における脳室周囲陽性像

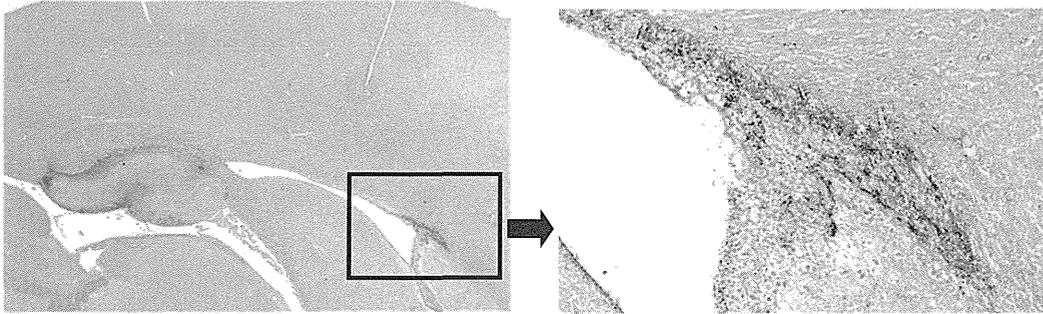


図 4. 263K(IP)70dpi における脊髓中心管陽性像

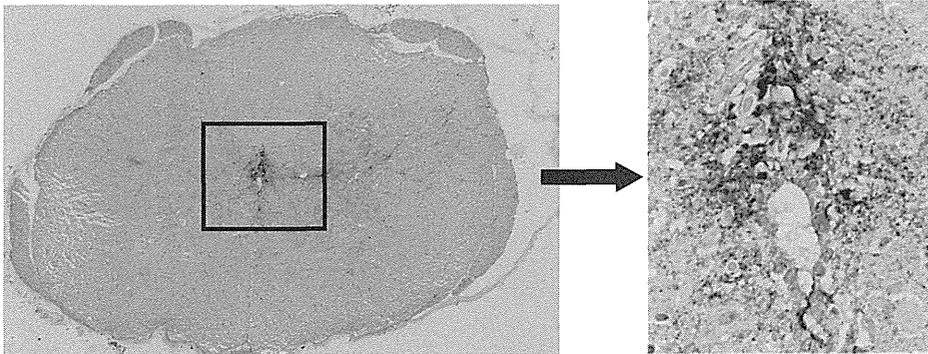


図 5. 263K 消化管神経叢陽性像

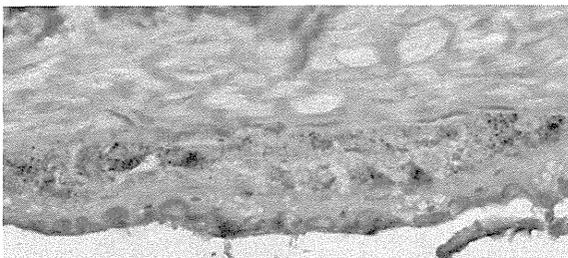


図 6. LBSE 消化管神経叢陰性像



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

分担研究者 岩丸 祥史 農研機構動物衛生研究所 主任研究員

研究協力者 松浦 裕一、岡田 洋之 (農研機構動物衛生研究所)

研究要旨

非定型牛海綿状脳症(BSE)は自然発症の可能性が示唆されている。非定型 BSE のヒトへの感染リスクを考える上で、可食部筋組織での感染性の有無ならびに感染価を明らかにすることは重要である。本研究では、非定型 BSE 実験感染ウシの筋組織に存在するプリオン感染性を明らかにし、食肉を介した非定型 BSE のヒトへの感染リスクを定量的に評価することを目的とする。H27 年度は可食部筋組織に分布する非定型 BSE プリオンの感染価を測定するためにウシ型トランスジェニックマウスへの感染実験を開始した。また、ヒト型トランスジェニックマウスへの感染実験の結果から、非定型 H-BSE プリオンのヒトへの感染リスクが L-BSE や C-BSE と比べて低いことが考えられた。

A. 研究目的

非定型牛海綿状脳症 (BSE) は、定型 BSE (C-BSE) と異なる生物学的ならびに生化学的性状を示し、L-BSE と H-BSE が存在する。C-BSE プリオンはヒトに感染し変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因であり、L-BSE プリオンはこれまでの動物実験でウシだけでなくヒトへの感染リスクも示唆されている。C-BSE もしくは L-BSE、H-BSE の臨床症状期の牛において、感染因子である異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が中枢や末梢の神経系に加えて筋組織にも蓄積するから、可食部筋組織での感染性の有無やその感染価を明らかにすることは、ヒトへの感染リスクを考える上で重要である。本研究では、非定型 BSE 実験感染ウシの筋組織に存在するプリオン感染性を調べ、食肉を介した感染リスクを定量的に評価することを目的とする。

H27 年度は、トランスジェニック (Tg) マウスへの感染実験を実施して、実験感染ウシの筋組織に分布するプリオンの感染価を測定すること、ヒトプリオン蛋白質遺伝子を過剰発現するヒト型 Tg マウスへの感染実験により非定型 BSE のヒトへの感染リスクを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 実験感染牛の筋組織を用いた Tg マウス感染実験

臨床症状を呈した L-BSE 実験感染ウシの筋組織 (最長筋、腰長筋、上腕三頭筋、半腱様筋) をリン酸緩衝液で 10% 乳剤に調整して、ウシプリオン蛋白質遺伝子を過剰発現するウシ型 Tg マウスの脳内に投与した。

2) 終末限界希釈法による Tg マウス感染実験

臨床症状を呈した H-BSE 実験感染牛の脳をリン酸緩衝液で 10 倍階段希釈して、ウシ型 Tg マウスの脳内に投与した。

3) ヒト型 Tg マウス感染実験

L-BSE、H-BSE、C-BSE に感染したウシの脳をリン酸緩衝液で 10% 乳剤に調整して、コドン 129 がメチオニンの遺伝子多型を示すヒト型 Tg マウスの脳内に投与した。

BSE の症状を呈したマウスを安楽死して、脳での異常型プリオンタンパク質の蓄積をウエスタンブロット法で調べた。PrP^{Sc} の蓄積したマウスを陽性として、BSE 感染陽性率ならびに投与から安楽死までを潜伏期間として求めた。

(倫理面への配慮)

本実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会にて承認され、プリオンの取り扱い、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症実験指針 (平成 15 年 10 月)」を遵守する。遺伝子改変動物を用いた動物実験は組換え実験委員会ならびに動物実験委員会にて承認さ

れ、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月)」を遵守する。

C. 研究結果

1) 実験感染牛の筋組織を用いた Tg マウス感染実験

筋組織を脳内投与したウシ型 Tg マウスは 180 日経過したが、臨床症状は観察されていない。

2) 終末限界希釈法による Tg マウス感染実験

非定型 H-BSE の希釈列を脳内投与したウシ型 Tg マウスは 120 日経過したが、いずれの希釈列でも臨床症状は観察されていない。

3) ヒト型 Tg マウス感染実験

非定型 BSE のヒトへの感染を C-BSE と比較解析するために、4 系統のヒト型 Tg マウス(#21、#38、#51、#7)を樹立した。ヒト型 Tg マウス脳内の PrP^C 発現量は、#21=#38>#51>#7であった(図)。BSE 感染牛脳の脳内投与実験の結果を表にまとめた。L-BSE ウシ脳乳剤を脳内投与すると、すべての系統に感染したが、H-BSE ではいずれのヒト型 Tg マウスにも感染しなかった。C-BSE では、ヒト型 Tg マウス #21 に感染したが、他の系統に感染しなかった。BSE の感染率を鑑みると、H-BSE は L-BSE や C-BSE と比べて、ヒト型 Tg マウスへの感染しにくいことが示された。

D. 考察

ウシ型 Tg マウスへの感染実験では、投与後日数が少なく、BSE 感染の有無を判定することはできない。今後、ウシ型 Tg マウスの臨床症状を観察し続けて、筋組織に分布する BSE 感染価ならびに H-BSE の感染価を明らかにすることが必要である。

ヒト型 Tg マウスの感染実験では、BSE のヒト

への感染リスクは、L-BSE、H-BSE、C-BSE でそれぞれ異なり、H-BSE がヒト型 Tg マウスに感染しにくいことが示された。脳内投与した L-BSE 感染牛脳のウシ型 Tg マウスへの感染価(ウシ脳 1g あたりの 50%致死量: LD₅₀/g)は、10^{6.83} LD₅₀/g であった(H26 年成果)。今後、終末限界希釈法による Tg マウス感染実験で H-BSE ウシ脳の感染価を明らかにすることによって、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを定量的に比較できると考えられた。

E. 結論

非定型 BSE 感染牛の筋組織、脳乳剤の希釈列を脳内投与したウシ型 Tg マウスの経過観察を行うことにより、筋組織ならびに脳の BSE 感染価を明らかにすることができる。非定型 H-BSE が L-BSE や C-BSE と比べてヒトに感染しにくいことを明らかにした。

F. 健康危険情報

これまでの研究成果で国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当事項なし

2. 学会発表

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

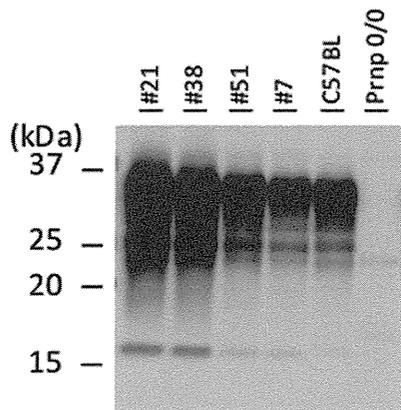


図 ウェスタンブロット法でのヒト型Tgマウス脳の PrPC 発現比較
 非感染のヒト型 Tg マウス脳を EP1802Y 抗体のウェスタンブロット法で発現比を調べた。野生型マウス(C57BL)の PrP^C 発現を 1 倍とすると、#21, #38 で 4 倍、#51 で 1.5 倍、#7 で 1 倍であった。Prnp 0/0 は PrP ノックアウトマウスを示す。

表 BSE のヒト型 Tg マウスへの感染

ヒト型 Tg マウス 系統	潜伏期間(投与後日数と感染率)		
	L-BSE	H-BSE	C-BSE
#21	758 ± 60 (11/11)	>857 (0/13)	714, 857 (2/10)
#38	729 ± 114 (13/15)	>844 (0/13)	>823 (0/7)
#7	825 (1/9)	>825 (0/13)	>857 (0/8)
#51	857 (1/11)	>857 (0/13)	>857 (0/11)

感染率：BSE 感染陽性数/投与数

潜伏期間：BSE 感染マウスの投与後日数を用いて平均と標準偏差 (mean days ± S.D.) を算出。

ただし、すべて陰性の場合は最長観察日数(n)を”>n”で表記。

III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
*堀内基広	牛海綿状脳症、変異クロイツフェルト・ヤコブ病	木村哲、喜田宏	人獣共通感染症改訂3版	医薬ジャーナル社	東京	2015	184-189

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	43-60	2015
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
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
*Sano K, Atarashi R, Nishida N.	Structural conservation of prion strain specificities in recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion.	Prion	9	237-243	2015
*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 Quantitative Assay of Amyloid-Seeding Activity in Human Brains Affected with Prion Diseases.	PLoS One	10	e0126930	2015

Homma 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
*福田 茂夫	道総研畜産試験場における非定型 BSE に関する研究	北海道獣医師会雑誌	59	260-265	2015
*Murayama, Y., Ono, F., Shimozaki, N. and Shibata, H.	L-Arginine ethylester enhances in vitro amplification of PrPSc in macaques with atypical L-type bovine spongiform encephalopathy and enables presymptomatic detection of PrPSc in the bodily fluids.	Biochem Biophys Res Commun.	470	563-568	2016
Saijo E, Hughson A, Raymond G, Suzuki A, Horiuchi M, Caughey B.	PrPSc-Specific C-terminal Antibody Reveals Conformational Differences between Prion Strains.	J Virol			in press
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

*代表的成果として、「IV. 研究成果の刊行物・別刷」の項に掲載した。