

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
（H26-食品-一般-004）

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ご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標として、これまでに培った技術・経験および科学的知見を活用して、項目 1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明に資する研究、項目 2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究、項目 3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定、に資する研究を進める。

本研究で取り組む、非定型 BSE 感染牛の中枢神経系における 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 経口接種力ニクイザル（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、力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は、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

C . 研究結果

1)非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明。

1-1) L-BSE 感染牛の病態解析

L-BSE を脳内接種した牛を接種後 4.7 ヶ月で病理解剖し、中枢神経系組織における PrP^{Sc} の蓄積を調べた結果、中脳、橋および延髄にわずかな PrP^{Sc} の蓄積を確認した。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 ニップル 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 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性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、体液の採取等をする。

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 の組織内伝播に関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