

1 . 定型および非定型 BSE の識別・高感度検出用 RT-QuIC 法の確立、定型および非定型 BSE 感染マウスのトランスクリプトーム

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科 教授

研究協力者 山崎 剛士 (北海道大学大学院 獣医学研究科 助教)

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学大学院・獣医学研究科 特定専門職員)

研究要旨

定型 BSE (C-BSE) および非定型 BSE (L-BSE および H-BSE) のモニタリングに使用可能な実用的な Real-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法として、平成 27 年度、シカ PrP (rCerPrP) を基質として RT-QuIC 法を行うことで、被検脳乳剤が最高濃度でも C-BSE および L-BSE が検出可能であることを報告した。しかし、この方法では C-BSE と L-BSE を識別できなかった。本年度は、この反応系に非感染牛脳乳剤を加えることで、L-BSE の RT-QuIC 反応は阻害されないが、C-BSE の RT-QuIC 反応は阻害されることを見出した。この現象を応用することで、C-BSE と L-BSE を高感度に検出でき、かつ、一回の反応で識別できる RT-QuIC 法が確立できた。しかし、C-, L-, H-BSE を一回の反応で識別できる RT-QuIC 法の確立には至らなかった。

C-, L-, H-BSE プリオンが引き起こす病気は同一ではないが、その違いの詳細は不明である。そこで、各々のプリオンが引き起こす病気の相違を明らかにするために、C-, L-, H-BSE プリオンを接種したウシ PrP 過発現マウス (TgBovPrP) の脳幹における網羅的遺伝子発現解析を行った。C-, L-, H-BSE プリオン感染 TgBovPrP で共通して発現が上昇する遺伝子群には、宿主の自然免疫応答に関与する分子など、これまでプリオン感染動物のミクログリアで発現が上昇することが報告されている遺伝子が含まれていた。一方、K-mean クラスタリングにより、C-, L-, あるいは H-BSE プリオン特異的に発現が上昇する遺伝子群の存在が明らかとなった。病原体特異的に発現が変化する遺伝子群は、特長的な Gene Ontology に集約される傾向が認められず、変化の生物学的意義の推測は今後の課題であるが、各々のプリオン感染特異的に発現が変化する遺伝子群の存在は、C-, L-, H-BSE プリオンが惹起する神経変性の性質が異なる可能性を示唆している。

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, C-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、C-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 C-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 (L-BSE)、H 型 (H-BSE) に分類され、これまでに 120 例が確認されている。

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 1,000 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。平成 27 年度、シカ PrP (rCerPrP) を基質として RT-QuIC 法を行うことで、被検脳乳剤が最高濃度でも C-BSE および L-BSE が検出可能であることを報告した。しかし、

この方法では C-BSE と非定型 BSE を識別できなかった。そこで、本年度は、rCerPrP を用いる RT-QuIC 法を応用して、C-BSE と非定型 BSE を一回の RT-QuIC 法で区別可能な方法の確立を行った。

C-, L, H-BSE プリオンが引き起こす病気は同一ではないが、その違いの詳細は不明である。そこで、各々の病原体が引き起こす病気の相違点を明らかにするため、C-, L, H-BSE プリオンを接種したウシ PrP 過発現マウス (TgBovPrP) の脳幹における網羅的遺伝子発現解析を行った。

B . 研究方法

1) 組換え PrP (rPrP) タンパク質の精製と RT-QuIC 法

rPrP は昨年と同様の方法で実施した。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 μ M EDTA, 10 μ M ThT 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。

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。また、H-BSE 感染牛の脳乳剤は農研機構動物衛生研究部門から分与を受けた。陰性対照として、BSE 非感染牛脳を用いた。

2) 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析

C-, L-, H-BSE 感染牛脳乳剤を脳内接種後、経時的に、脳幹および視床を実態顕微鏡下で回収した。組織を回収後直ちに TRIzol 試薬を用いて total RNA を回収した。RiboMinus Eukaryote Kit (Life Technologies 社) により rRNA および tRNA を除去した後、Ion AmpliSeq RNA library Kit 2.0 を用いて cDNA ライブラリを作製し、エマルジョン PCR により cDNA 断片をビーズに固相化した。Ion PI Sequencing 200 Kit を用いて、次世代シーケンサー-Ion Proton (Ion Torrent) により RNA-Sequencing を行った。平均長 150-200 base、1 サンプル当たり約 3 G base を解析した。

cDNA 断片のマウスゲノム上へのマッピングに

は Ion Torrent Suite Software を使用した。その後の定量発現解析、経時的遺伝子発現解析には Avadis NGS Software (Strand 社、既設) を用いた。また、Avadis NGS あるいは Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen 社、既設) を用いて Gene Ontology 解析および Pathway 解析を行った。

(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 2016-1-42)。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) rCerPrP を用いる RT-QuIC 反応による C-BSE と L-BSE の識別

rCerPrP を基質として用いた場合、C-BSE および L-BSE とともに、被検試料の脳乳剤濃度が最高となる 10^{-3} 希釈でも陽性となり (図 1)、rCerPrP のロットを変更しても再現性があった (結果は示さず)。また、L-BSE および C-BSE とともに 10^{-7} 希釈まで再現性良く陽性となることから、rCerPrP を用いた RT-QuIC 法は、ELISA や WB よりも 10,000 以上検出感度が高く、TgBovPrP を用いたバイオアッセイよりも 10 倍程度感度が高いことが確認できた。H-BSE も 10^{-3} ~ 10^{-8} 希釈で検出可能であった (図 2)。

この反応系に、終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えると、L-BSE の検出限界は 10^{-8} と 1 段階上昇したが、C-BSE の検出限界は 10^{-3} までと著しく低下した (図 1)。従って、rCerPrP を用いた RT-QuIC 反応を、非感染牛脳乳剤存在/非存在下で行うことで、一回の RT-QuIC 法で、C-BSE と L-BSE の高感度検出と識別が可能となる。この現象は、ロットの異なる非感染牛脳乳剤でも再現されることから、特定の脳乳剤でのみ生じる現象ではない (結果は示さず)。

組換えマウス PrP (rMoPrP) を基質として RT-QuIC 法を実施しても、 10^{-3} ~ 10^{-7} 希釈で C-BSE および L-BSE の検出が可能であるが、この反応系に非感染牛脳乳剤を加えると、C-BSE および L-BSE の RT-QuIC 反応がともに阻害されることから (結果は示さず)、C-BSE と L-BSE の高感度検

出と識別を同時に行うためには、rCerPrP と非感染牛脳乳剤の組み合わせが必要である。

rCerPrP を用いる H-BSE の RT-QuIC 反応は、C-BSE と同様に非感染牛脳乳剤により阻害された (図 2)。

2) C-, L-, H-BSE プリオン感染 TgBovPrP におけるトランスクリプトーム

図 2 に示す採材日に採材を行い、次世代シーケンサーを用いて RNA-sequencing を行った。それぞれ生存期間が異なるため、まず、宿主応答が明らかに認められる時期として、階層クラスタリングにより、陰性対照の非感染マウスと比較して、遺伝子発現パターンが、異なるクラスターとして分離できる日を評価の目安とした (図 3)。そうすると、L-BSE では、接種後 167 日、C-BSE では接種後 204 日、H-BSE では接種後 253 日までは、非感染マウスと区別できなかったことから、明瞭な宿主応答が生じるのは、これらの時点より後になると考えられた。

発現の低い遺伝子を除去、各タイムポイントの陰性対照 (n=2) に対して、2 倍以上発現が上昇もしくは低下した 1,570 遺伝子を抽出し、それらの遺伝子を用いて K-mean クラスタリングにより 12 群に分類した。

クラスター C-1 は、C-, L-, H-BSE プリオン感染 TgBovPrP とともに病末期に遺伝子発現が上昇する遺伝子群である (184 遺伝子)。これらには免疫応答や炎症に関わる遺伝子が数多く含まれており、これまでにプリオン病でミクログリアで発現が上昇するとの報告がある因子が多く含まれていた (図 4)。これに対し、C-2 (212 遺伝子)、C-3 (179 遺伝子)、および C-4 (200 遺伝子) はそれぞれ、L-BSE, C-BSE, および H-BSE プリオン感染 TgBovPrP でのみ発現が上昇する傾向にある遺伝子から構成されるグループであった (図 5-7)。

D. 考察

rCerPrP を基質に用いて、RT-QuIC の反応系に非感染牛脳乳剤を添加することで、C-BSE の異常型プリオンタンパク質の増幅は阻害されるが、L-BSE の異常型プリオンタンパク質の増幅は阻害されない、という現象を利用して、一回の RT-QuIC 反応で、検出感度を損なうことなく、C-BSE と L-BSE を識別可能となった。rMoPrP を基質とし

た場合は、非感染牛脳乳剤の添加により、C-BSE および L-BSE の増幅がともに阻害されることから、RT-QuIC に用いるシード (異常型プリオンタンパク質)、基質 (組換え PrP)、および脳乳剤に含まれる正常型プリオンタンパク質の組み合わせにより、結果が大きく変化する。rCerPrP 以外に、マウス、ハムスター、ウシ、およびハタネズミの組換え PrP を使用したが、被検試料の脳乳剤濃度が最高となる 10^{-3} 希釈でも安定して陽性となり、かつ 10^{-7} 希釈まで再現性良く陽性となるのは rCerPrP を基質とした RT-QuIC であり、rCerPrP のロットにも影響されなかった。これまで rCerPrP を基質とした BSE 検出系は報告されていないが、rCerPrP は BSE プリオンの増殖に有効であると考えられる。

C-, L-, H-BSE プリオン感染 TgBovPrP の脳幹のトランスクリプトームでは、3 種の BSE プリオン感染で共通して発現が上昇するのは、主にミクログリアで発現が上昇する遺伝子群であった。つまり、ミクログリアの活性化は BSE プリオンの種類を問わず共通の現象であることが示された。この結果は、これまで DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により報告されてきた、プリオン病の進行に伴い、脳内で発現が上昇する遺伝子の多くは、ミクログリアの活性化に起因していることを示している。一方で、K-mean クラスタリングにより、C-, L- あるいは H-BSE プリオンの感染に対して特異的に発現が上昇する遺伝子群の存在を明らかにした。Gene Ontology 解析では、これらの遺伝子群の特徴を推測することは出来なかったが、解析を進めることで、BSE のみならず、プリオン病の神経変性機構に関わる因子の同定へと発展する可能性がある。ミクログリアが同じように活性化する一方で、C-, L-, H-BSE 病原体の感染に対する宿主の反応の違いは、プリオン病の神経変性機構を考える上で非常に興味深い現象である。

E. 結論

C-BSE と L-BSE プリオンの高感度検出および識別を一回の反応で実施可能な RT-QuIC 法を確立した。また、C-, L-, H-BSE プリオン感染ウシ PrP 発現トランスジェニックマウスの比較から、3 種の BSE に共通した宿主応答、およびそれぞれの BSE プリオンに特長的な宿主応答があることを

明らかにした。

F . 健康危険情報
該当なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Saijo E, Hughson AG, Raymond GJ, Suzuki A, Horiuchi M, and Caughey B. PrP^{Sc}-Specific Antibody Reveals C-Terminal Conformational Differences between Prion Strains. *J. Virol.*, 90: 4905-4913, 2016.
- 2) Hasebe R, Tanaka M, Suzuki A, Yamasaki T, and Horiuchi M. Complement factors alter the amount of PrP(Sc) in primary-cultured mouse cortical neurons associated with increased membrane permeability. *Virology*, 496: 9-20, 2016.
- 3) Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, and Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and primary-cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. *J. Gen. Virol.*, 97: 2030-2042, 2016.
- 4) Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and 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*, 10: 305-318, 2016.

2.学会発表

- 1) Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, and Horiuchi M.

Comparison of abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) in prion-infected cell lines and primary cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.

- 2) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion-infected mouse brain by flow cytometry. Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.
- 3) Kuroda M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Transcriptome analysis of microglia and astrocytes in prion-infected mice. Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.
- 4) Horiuchi, M. Activation state of glial cells in prion diseases, Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.
- 5) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Utility of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CDW prions by RT-QuIC. The 64th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology, Sapporo, Japan, Oct, 23-25, 2016.

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

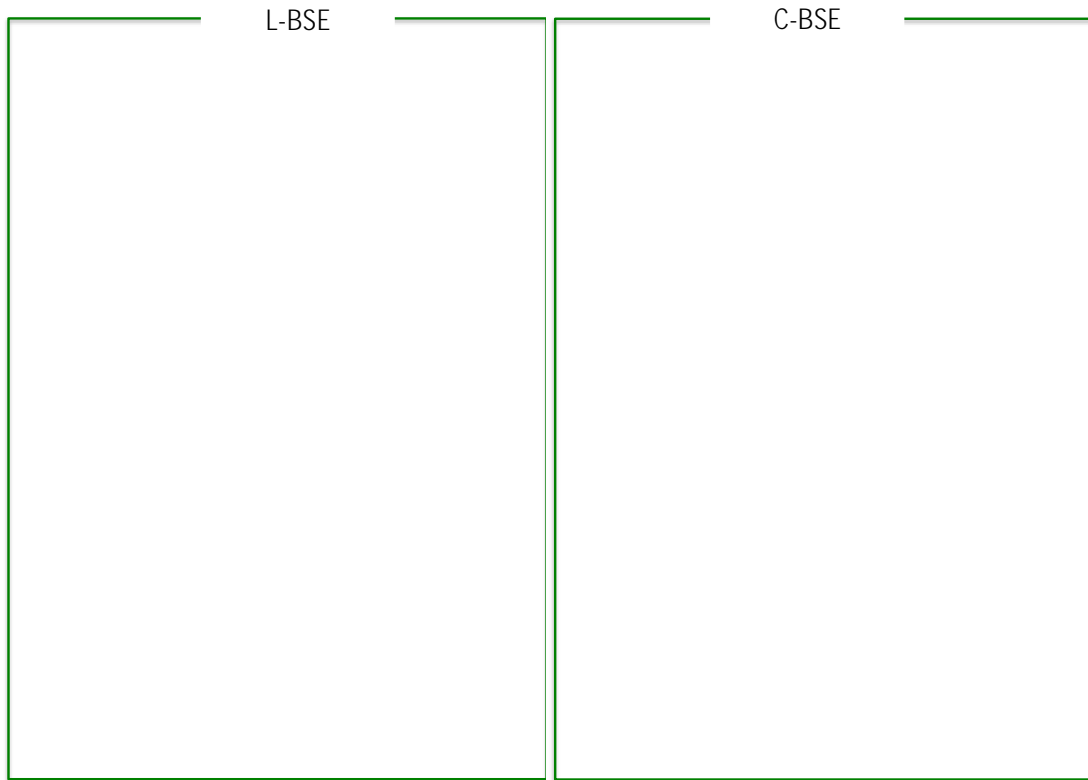


図1 .rCerPrPを用いたRT-QuIC法によるCおよびL-BSE由来異常型プリオンタンパク質の検出と、非感染脳乳剤添加によるC-BSE由来異常型プリオンタンパク質検出の阻害。L-BSEの検出(左)は、非感染牛脳乳剤を添加しても阻害されないが、C-BSEの検出(右)は著しく阻害される。

BSE 組換え PrP	L-BSE		C-BSE		H-BSE	
	正常牛脳乳剤		正常牛脳乳剤		正常牛脳乳剤	
	なし	あり	なし	あり	なし	あり
シカ	10^{-3} - 10^{-7}	亢進 (感度上昇)	10^{-3} - 10^{-7}	抑制 (感度低下)	10^{-3} - 10^{-8}	抑制 (感度低下)
マウス	10^{-3} - 10^{-7}	抑制	10^{-3} - 10^{-7}	抑制	10^{-4} - 10^{-8}	抑制
ハムスター	10^{-4} - 10^{-7}	ND	ND	ND	10^{-4} - 10^{-6}	ND
ウシ	10^{-4} - 10^{-6}	抑制	10^{-3} - 10^{-5}	抑制	10^{-4} - 10^{-7}	ND
ハタネズミ	10^{-4} - 10^{-7}	ND	10^{-4} - 10^{-6}	ND	10^{-4} - 10^{-8}	ND

図2 . 各種動物由来組換え PrP を用いた RT-QuIC 法の C-, L-, H-BSE の検出感度。

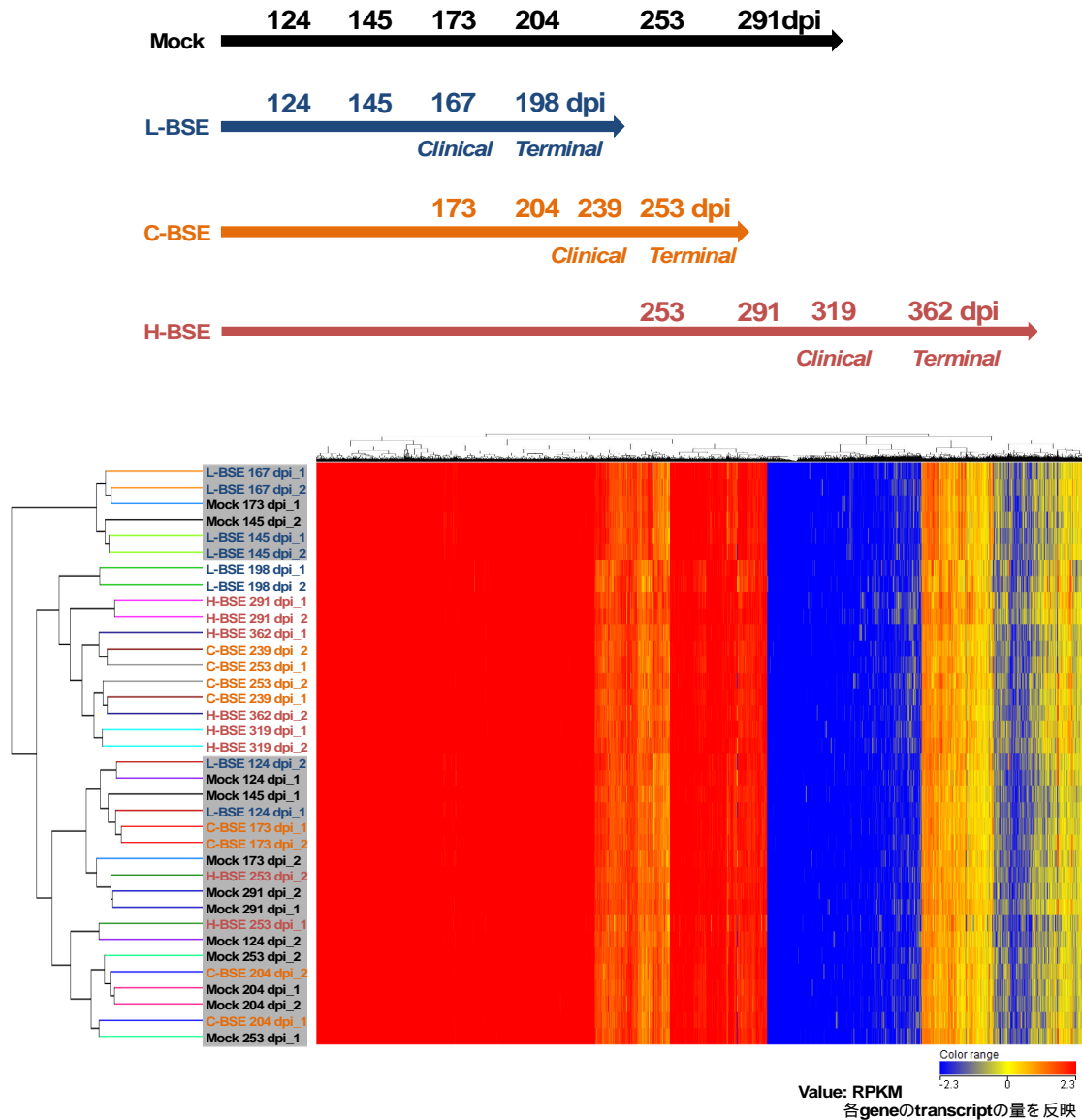


図3．採材スケジュール（上）と階層型クラスタリング（下）。グレーでハイライトしたクラスターは非感染 TgBovPrP 由来の試料が含まれるため、宿主応答が非感染 TgBovPrP と明確に区別できないと判断した。ハイライトしていないクラスターは感染 TgBovPrP のみが含まれることから、感染に伴う遺伝子発現の変化が非感染 TgBovPrP と明確に区別できる実験群と判断した。L-BSE 接種群では接種後 198 日 (dpi)、C-BSE 接種群では 239dpi 以降、H-BSE 接種群では 291dpi 以降で、非感染 TgBovPrP と遺伝子発現で明確な差が認められた。

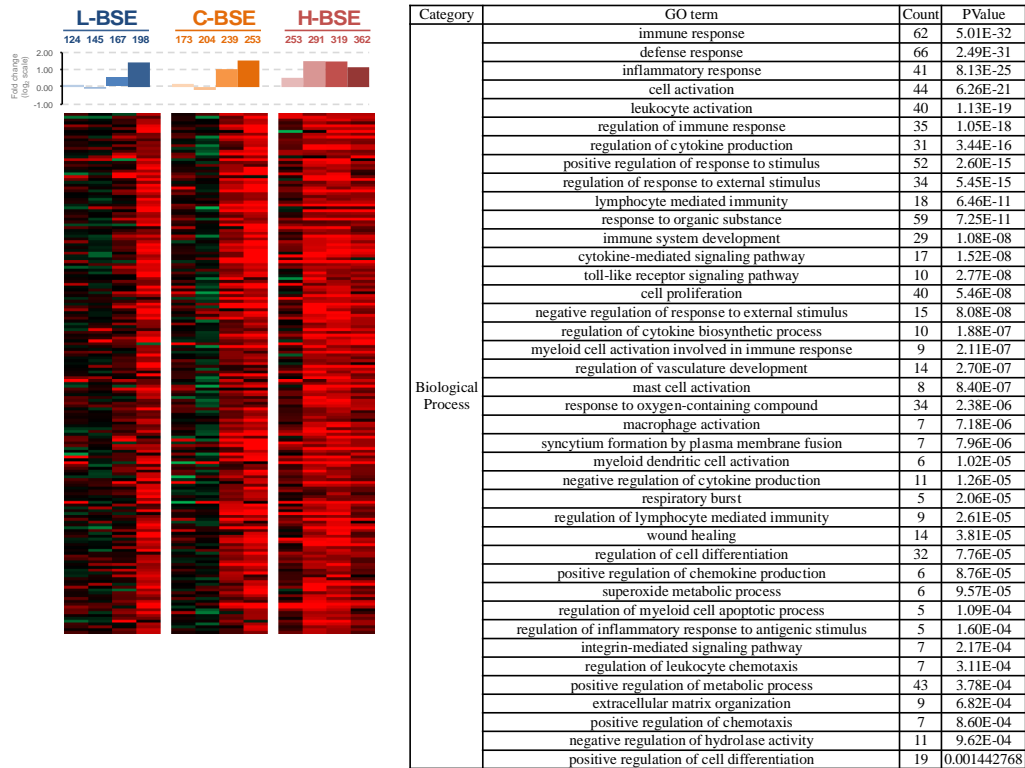


図 4. K-mean クラスタリングにより C-, L-, H-BSE プリオン感染 TgBovPrP とともに病気の進行に伴いに遺伝子発現が上昇する遺伝子群 (C-1: 184 遺伝子) の Gene Ontology 解析。

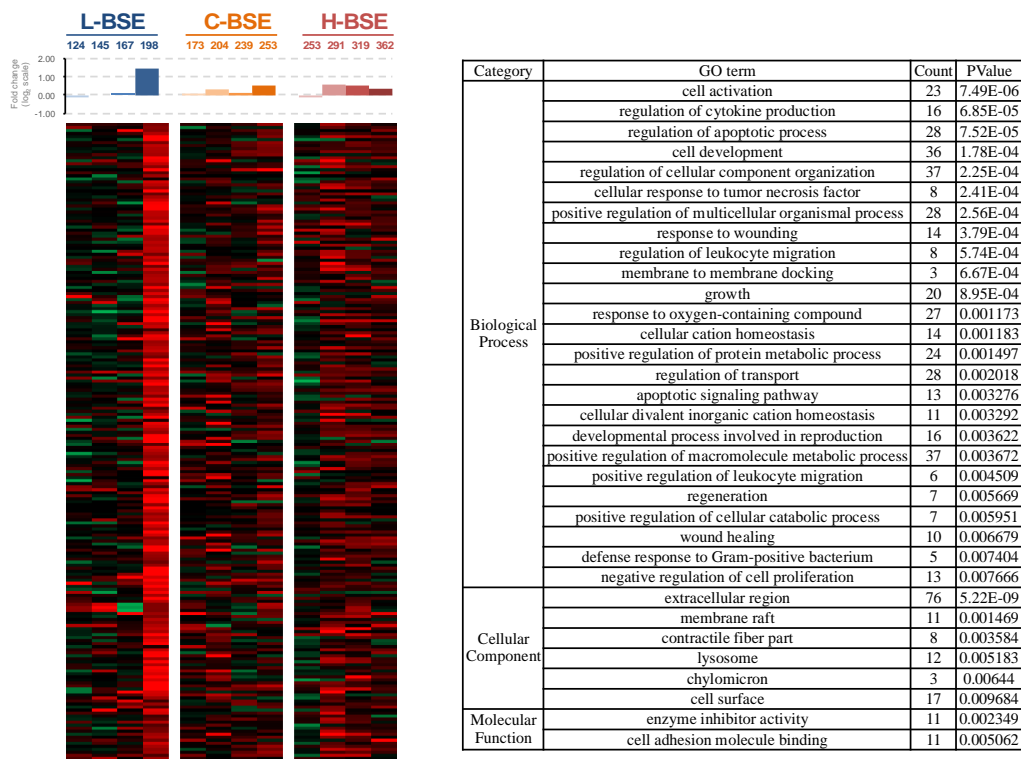
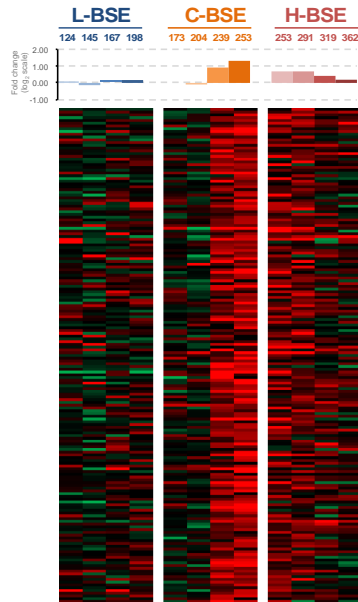
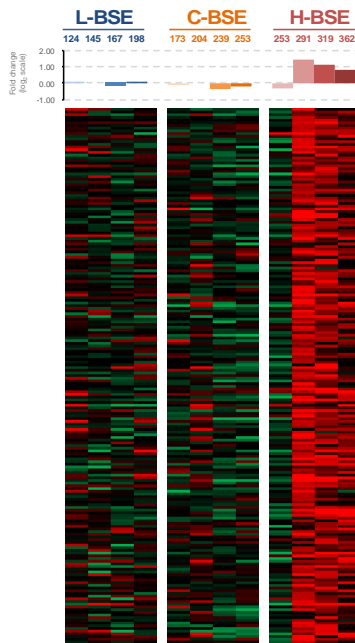


図 5. K-mean クラスタリングにより L-BSE プリオン感染 TgBovPrP で特異的に遺伝子発現が上昇する遺伝子群 (C-2: 212 遺伝子) の Gene Ontology 解析。



Category	GO term	Count	PValue
Biological Process	positive regulation of response to stimulus	32	1.32E-06
	positive regulation of immune system process	18	2.23E-05
	positive regulation of hemopoiesis	9	4.58E-05
	inflammatory response	15	7.42E-05
	granulocyte chemotaxis	7	8.64E-05
	positive regulation of intracellular signal transduction	17	4.26E-04
	myeloid leukocyte activation	7	9.06E-04
	regulation of MAP kinase activity	8	0.003078
	regulation of cell-cell adhesion	9	0.004506
	positive regulation of protein kinase activity	9	0.005098
	response to starvation	6	0.005312
	carboxylic acid biosynthetic process	7	0.005695
	regulation of lipid catabolic process	4	0.006903

図 6. K-mean クラスタリングにより C-BSE プリオン感染 TgBovPrP で特異的に遺伝子発現が上昇する遺伝子群 (C-3: 179 遺伝子) の Gene Ontology 解析。



Category	GO term	Count	PValue
Biological Process	regulation of response to external stimulus	16	3.31E-04
	cell activation	17	7.83E-04
	regulation of immune system process	20	0.001153614
	negative regulation of neurological system process	3	0.007763385
Cellular Component	extracellular space	24	0.002224856
Molecular Function	glycoprotein binding	7	1.97E-04
	endopeptidase activity	11	0.002059756

図 7. K-mean クラスタリングにより H-BSE プリオン感染 TgBovPrP で特異的に遺伝子発現が上昇する遺伝子群 (C-4: 200 遺伝子) の Gene Ontology 解析。

2. Wire-QUIC 法によるプリオン不活化法の評価

分担研究者 新 竜一郎 宮崎大学医学部 感染症学講座 教授

研究協力者 森 剛志 (宮崎大学医学部・感染症学講座)

研究要旨

本研究では、微量なプリオンを試験管内で検出可能な RT-QUIC 法を応用し、ステンレススチールワイヤーに付着したプリオンの活性能を 2 日間程度で評価できる Wire-QUIC 法を開発した。実際のプリオン不活化評価においては、NaOH(1 mol/L) 2 時間処理することでプリオン活性が Wire-QUIC 法の検出感度以下まで不活化されたことがわかった。一方、3% SDS 100、10 分処理ではプリオンシード活性が残存し、不活化効果は不完全であることが判明した。これらの結果から、Wire-QUIC 法は、ヒトプリオン(sCJD)を含むプリオン一般を対象とした不活化評価が可能であり、さらに効果的な医療機器等のプリオン除去法を見出す上で有用であることが示された。

A. 研究目的

医療機器の滅菌・不活化は、医原性疾患の発生予防において必須の技術である。医原性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)は、感染性を有する病原体プリオンにより引き起こされるが、プリオンの本態は異常型プリオンタンパク(PrP)の凝集体であり、通常のウイルス・細菌等といった微生物で用いられる滅菌・不活化法に対して非常に耐性であるため、完全に滅菌・不活化することが困難であることが知られている。またその評価には動物感染実験が必要でコストと数か月以上の期間がかかる。そこで、本研究ではこれまでに我々の開発した RT-QUIC (Real-time quaking-induced conversion)法を応用して、プリオンの滅菌・不活化法を短期間で低コストで評価できる方法を新たに開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) RT-QUIC 法のシードとしてハムスタープリオン株(263K)および CJD 病患者(sCJD)由来脳乳剤を PBS(-)にて段階希釈して用いた。Wire-QUIC 法には、ステンレスワイヤー(SUS304, diameter 0.2 mm)を 5mm の長さに切断し、それぞれの濃度に希釈した脳乳剤を吸着させ、1 日乾燥させたものを用いた。

2) RT-QUIC 法は、QUIC 反応バッファー(50 mM PIPES pH 7.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 μM Thioflavin T (ThT)に 263K シードの場合は recHamPrP23-231(80 μg/mL)、sCJD シードの場合

recHuPrP23-231(100 μg/mL)とし(トータル 95 μL)、最後に脳乳剤 5 μL を加え、混合した。Wire-QUIC 法を行う際、96 well plate 内にあらかじめ QUIC 反応バッファーを入れ、その後脳乳剤吸着ワイヤーを挿入した。その後、それぞれの plate は蛍光 Micoplate Reader (Infinite F200 PRO fluorescence plate reader) を用いて RT-QUIC 反応を行なった。

3) プリオン滅菌・不活化法としては下記の 2 種類の方法で脳乳剤あるいは脳乳剤吸着ワイヤーに対して行った。NaOH (1M)溶液 2 時間、SDS(3%)溶液 100、10 分

(倫理面への配慮)

本研究課題では、プリオンに感染している試料を用いるのに対し、すべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等ないように細心の注意を払って行った。患者検体は長崎大学医学部付属病院その他の共同研究グループにより患者・家族のインフォームドコンセントの下、採取され、供給された。

C. 研究結果

1) ステンレスワイヤーに吸着したプリオンを RT-QUIC 法により検出可能である(Wire-QUIC 法)

Wire-QUIC 法は、感度は希釈脳乳剤を直接シードとして RT-QUIC 反応を行った場合に比べてやや劣るものの、 $10^{2.8}$ SD₅₀ 以上のハムスター(図 1)

およびヒト(図 2)両方のプリオン株においてプリオン活性を検出することができた。一方、Wire-QuIC 法は、CJD 検体において高い濃度(10^{6.8} SD₅₀)ではプリオン活性を検出できなかったが、これと類似の現象はプリオン感染脳乳剤を直接シードとして添加した場合にも観察されていたことから、この現象は、脳乳剤中の阻害物質によるものと考えられる。

2) Wire-QUIC 法はプリオン不活化法を評価可能である

プリオン不活化評価においては、1 mol/L NaOH 2 時間処理することでプリオン活性が検出されなくなり(図 3)、検出感度以下までプリオンが不活化されたことがわかった。一方、3% SDS 100 10 分処理ではプリオンシード活性が残存し、完全な不活化効果は得られなかった。

D. 考察

Wire-QUIC 法の利点は、プリオンをステンレスワイヤーに吸着させた後に反応を行うため、プリオン不活化のため激しい物理的・化学的処置を行った後もステンレスワイヤーを洗浄することにより物理的・化学的処置の影響を排除できることである。またプリオン感染動物実験と比較して、感度も高く、短期間で判定可能であることも大きな利点と言えよう。今回の結果から、Wire-QUIC 法は、ヒトプリオン(sCJD)を含めたプリオン一般を対象とした不活化評価が検討でき、医療機器等のプリオン除去法を見出す上で有用であることが示唆された。

E. 結論

今回、我々は RT-QUIC 法を応用して、プリオンの滅菌・不活化法を短期間かつ低コストで評価できる Wire-QUIC 法の開発に成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori T, Atarashi R, Furukawa K, Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Nakagaki T, Ishibashi D, Ichimiya K, Hamada M, Nakayama T, Nishida N. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. *Sci Rep.*, 6: 24993, 2016
- 2) McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, de Vil B, Sarros S, Satoh K, Cheng K, Cramm M, Fairfoul G, Schmitz M, Zerr I, Cras P, Equestre M, Tagliavini F, Atarashi R, Knox D, Collins S, Haik S, Parchi P, Pocchiari M, Green A. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol.*, 80(1): 160-165, 2016
- 3) Ishibashi D, Nakagaki T, Ishikawa T, Atarashi R, Watanabe K, Cruz FA, Hamada T, Nishida N. Structure-Based Drug Discovery for Prion Disease Using a Novel Binding Simulation. *EBioMedicine.*, 9: 238-249, 2016
- 4) Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Müller-Cramm D, Collins S, Atarashi R, Satoh K, Orrù CD, Groveman BR, Zafar S, Schulz-Schaeffer WJ, Caughey B, Zerr I. The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nat Protoc.*, 11(11): 2233-2242, 2016
- 5) Takatsuki H, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Murayama S, Atarashi R, Nishida N, Satoh K. Prion-Seeding Activity Is widely Distributed in Tissues of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. *EBioMedicine.*, 12: 150-155, 2016

2. 学会発表

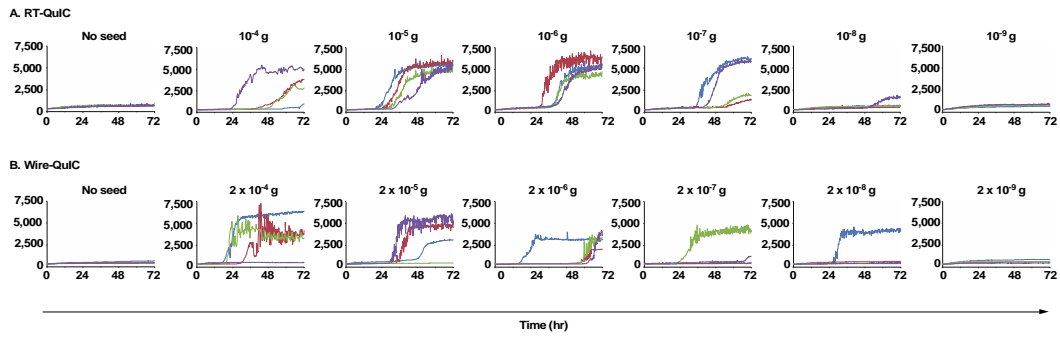
- 1) Mori, T., Atarashi, R., Takatsuki, H., Satoh, K. "Wire-QuIC": A new detection system of human prion. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Tokyo, Japan)
- 2) Ishibashi, D., Nakagaki, T., Atarashi, R., Nishida, N. Prion strain-dependent effect of macroautophagy on abnormal prion protein. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Tokyo, Japan)
- 3) Mori, T., Atarashi, R., Satoh, K., Ishibashi, D., Nakagaki, T., Nishida, N. Wire-QuIC reaction can detect abnormal human prion seeds from

contaminated stainless steel-wire. The 64th annual meeting of the Japanese society for virology (Oct, 23-25, Sapporo, Japan)

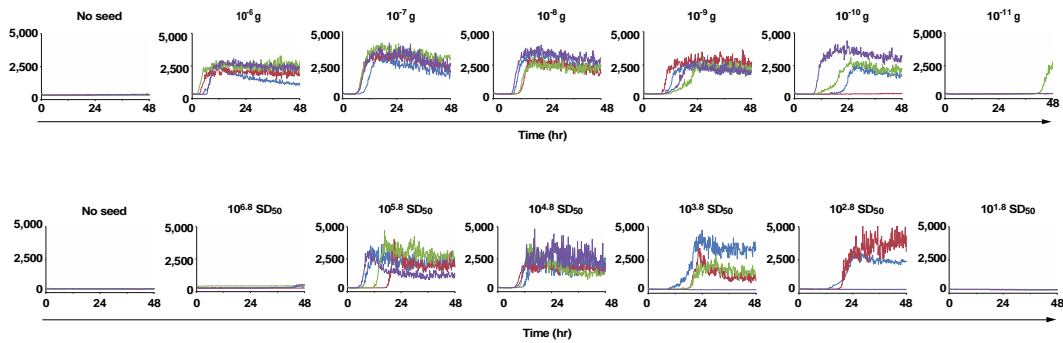
- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

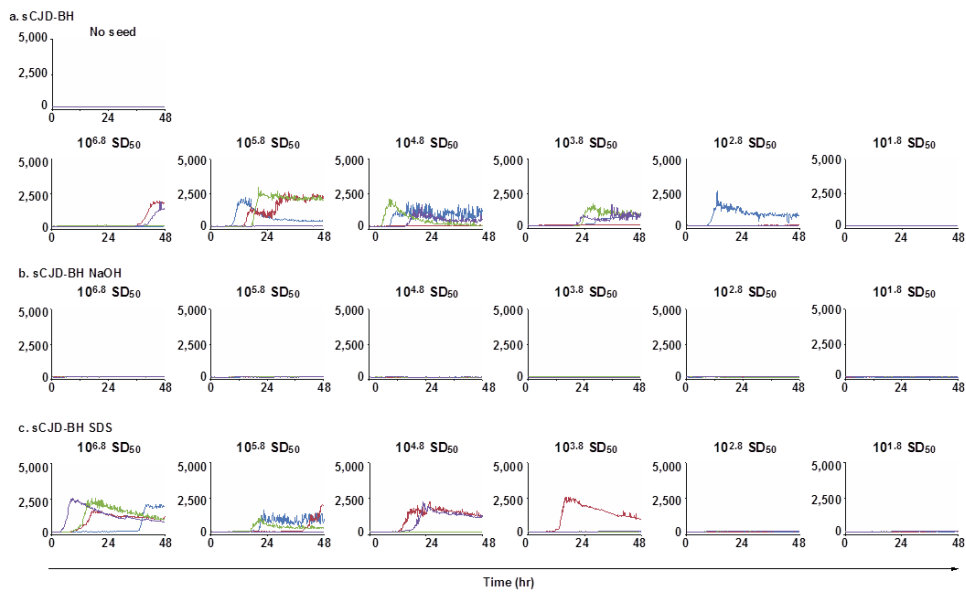
☒ 1



☒ 2



☒ 3



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

分担研究者 柴田 宏昭 自治医科大学 先端医療技術開発センター

共同利用コーディネーター部門 講師

研究協力者 小野 文子 千葉科学大学 危機管理学部 動物危機管理学科 准教授

村山 裕一 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門

越境性感染症研究領域・プリオン病ユニット 領域長補佐

研究要旨

ヒトへの非定型 BSE プリオンの感染リスク評価を目的に、カニクイザルを用いた感染実験を行った。非定型 BSE である L-BSE は、脳内接種モデルにより、サルへの伝播が確認されているが、経口投与は 10.4 年を経過した時点でも発症は認められず、近いうちに安楽死を行い、網羅的な解析を行う。同じく非定型 BSE である H-BSE のサルへの伝播を確認するための脳内接種と食を通じての水平感染リスクを評価するための経口投与の実験を行った。いずれも接種してから 1.4 年を経過したが、発症には至っていない。定型 BSE の経口投与、輸血接種ザルは、未発症のまま、それぞれ接種してから 13.5 年目、10.4 年目に安楽死を行った。安楽死直後の脳 MRI 画像では、脳室拡張に伴う脳の萎縮等の異常所見は見られず、輸血ザルにおいては、調べた神経及び末梢組織からは PrP^{Sc} は検出されなかった。BSE プリオンの水平感染リスクを評価する上で、サルを用いたモデルは重要であるため、引き続き、生存個体については経過観察を行い、安楽死した個体については、網羅的解析を進める。

A. 研究目的

非定型 BSE 由来プリオンは、定型 BSE 由来プリオン (C-BSE-P) と比べて、感染病態、ヒトへの感染リスクなど不明な点が多い。そこで、ヒトに近い霊長類を用いて、非定型 BSE (L-BSE または H-BSE) 感染ウシ脳乳剤を経口接種し、経口による L-BSE および H-BSE 由来プリオン (L-BSE-P、H-BSE-P) のヒトへの感染リスク・感受性を推定する。また、L-BSE-P はサルへの親和性が非常に高いことは脳内接種実験で既に確認しているが、H-BSE-P も霊長類に対して親和性があるのかを確認するために直接、サル脳内に接種する感染実験を行い、今までに蓄積した C-BSE-P および L-BSE-P 感染サルのデータと比較し、ヒトにおける H-BSE-P の感染病態も推測する。得られたデータから非定型 BSE の食品を介した感染リスクを外挿し、安全対策等に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1) 供試動物と接種方法

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター (茨城県つくば市) で

育成された 1.2~2.4 歳の雄カニクイザル 9 頭を用いた。供試動物は、ABSL3 施設内のアイソレーターにおいて馴化飼育後、感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27、相対湿度 50-60%、12 時間照明 (7 時~19 時) に設定した。アイソレーターの前面及び側面には窓を設け、前方及び隣のサルとアイコンタクト出来る環境とした。飼料は固形飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.)70g 及びリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

2) 実験群および接種材料

実験群について下記に記載する。

C-BSE 初代接種群

BSE (BSE JP/6 和歌山) 感染ウシの 10% 脳乳剤をカニクイザル 2 頭 (#5, #9) 2 頭に経口投与 (脳乳剤 2.0 ml x 3 回) した。

2 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。

C-BSE 第 2 継代接種群

BSE (BSE JP/6 和歌山) 感染ウシの 10% 脳乳剤をカニクイザル脳内に接種し、伝播したカニクイザル (#7) の剖検時の血液 (40 mL) をカニクイザル (#12) に静脈内接種した。

この1頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。

L-BSE 初代接種群

BSE (BSE JP/24 佐世保) 感染ウシの20%脳乳剤のカニクイザル2頭(#18, #19)に経口投与(脳乳剤 5.0 ml x 8回)した。

2頭は経過観察中。

H-BSE 初代接種群

カニクイザル4頭を下記の2群に分け、BSE(カナダ由来感染ウシ脳乳剤を脳内接種 動衛研)感染ウシの10%脳乳剤の脳内接種及び20%脳乳剤の経口投与を行った。

脳内接種(脳乳剤 0.2 ml) 2頭(#24, #25)

経口投与(脳乳剤 5.0 ml x 8回) 2頭(#26, #27)

脳内接種群、経口投与群共に経過観察中。

3) 接種および材料採取方法

経口接種は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテテルを胃内に挿入し、前述の投与量にて実施した。

輸血接種は塩酸ケタミン麻酔下で、伏在静脈より血液を輸血した。

脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後、イソジンで消毒し、頭皮膚切開、側頭部頭蓋骨に直径2mmの穿孔部を作製し、視床に脳乳剤0.2mlを注入した。注入後、皮膚を縫合し、手術日より3日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

接種前及び接種後は約3ヶ月おきに血液、脳脊髄液(CSF)、唾液及び尿の採取を行った。動物は塩酸ケタミン麻酔下で血液は大腿静脈より採取した。脳脊髄液は背部剃毛後イソジンで消毒し、第3~第5腰椎椎間より採取した。鼻腔細胞の採取を試みた。片側鼻腔内を生理食塩水1mLで3回洗浄を行い、両鼻腔内で計6mLの洗浄液を回収した。回収した鼻腔洗浄液は2回遠心洗浄を行い、鼻腔洗浄細胞を回収した。

安楽死は塩酸ケタミンにより鎮静後、ヘパリンを静脈内注射し全身血液の凝固防止を行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により行った。安楽死後、脳及び主要臓器の組織の一部を摘出し、凍結保存及びホルマリン浸漬を行った。

4) 解析方法

1. 行動観察

行動観察・ビデオ撮影

アップルテスト(運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

2. 高次脳機能解析

食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルの報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行う。本評価系は#18~#27に実施した。

3. BSE 感染サルの体液中の PrP^{Sc} 動態解析

定期的に採材された体液類(血液、脳脊髄液、尿および唾液)について解析を行った。超音波処理/界面活性剤で可溶化した白血球分画またはリンタングステン酸沈殿法で濃縮した体液類をシードに用い、連続PMCA法で解析した。各ラウンドのPMCA産物をProteinase K消化後、ウエスタンブロット(WB)法によりPrP^{Sc}を検出した。

4. MRI 撮像

P3動物実験区域内で管理されている動物は生存したまま管理区域外への搬出ができないため、MRI撮像は安楽死直後に行った。安楽死したサルはアクリル製密封型コンテナに封じ込めてP2動物実験区域内のMRI室に搬送した。MRI撮像は3T MRI装置(MAGNETOM Allegra [Siemens社])を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高いS/Nを持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルのCP型コイルを用いてT1-3D、T2、プロトン強調画像、Flair画像を撮像した。

(倫理面への配慮)

BSE-P接種動物はすべて改良型のP3アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするよう改良した。ケージ内にはステンレスの鏡やチェーンを入れると共に、定期的に行うアップルテストや食物回収試験により、ヒトとの触れ合いが福祉向上に有効

と考え、ケージ内サルへのストレスの軽減に努めた。材料採取及び脳波測定は麻酔下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応及び輸液療法等による維持管理を行った。

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、過剰量のペントバルビタールナトリウム静脈内投与により行った。

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本指針」を遵守し、医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験委員会の承認を得て行った。病原体の取扱いについては、医薬基盤・健康・栄養研究所バイオセーフティー委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 定型 BSE 接種群の臨床経過及び剖検

C-BSE ウシ脳乳剤経口投与群 (#5、#9) は投与後約 13.5 年、輸血投与 (#12) は投与後 10.4 年を経過したが、異常行動や運動障害はなく、定期的に撮影したビデオ画像を確認しても、神経及び精神症状共に異常は見られず (data not shown)、発症の兆しさえ確認できなかった。また、定期的に採材した体液類を PrP^{Sc} 高感度検出系である連続 PMCA 法を用いて検査し PrP^{Sc} の検出を試みたが、全てのサンプルにおいて検出限界以下であった (図 1)。なお、未発症のまま、#5、#9、#12 は C-BSE-P 投与後それぞれ、14.6 年目、14.4 年目、10.4 年目に安楽死を行った。安楽死直後に脳の MRI 撮像を行ったが、脳室拡張を伴う脳萎縮などの異常所見は認められなかった (図 2)。また、剖検時の解剖所見も特に異常は見られなかった。#12 については、剖検時の主要な神経及び末梢組織を PMCA 法で解析したが、調べた組織からは PrP^{Sc} は検出されなかった (図 3)。

2) L-BSE 経口投与群の臨床経過

L-BSE ウシ脳乳剤経口投与個体 (#18、#19) は投与後 5.5 年を経過したが、発症症状は見られていない。連続 PMCA 法を用いて、定期的に採材した体液類を検査した。投与後 3.7 年の #18 の血漿から一過性に PrP^{Sc} が検出されたが、他の体液類からは検出されなかった (図 4 A)。#19 については、昨年度、投与後約 3.5 年目の唾液から PrP^{Sc} が検出されたことを報告したが、その後採材した唾液からは PrP^{Sc} は検出されなかった (図 4 B)。また、唾液サンプルから陽性反応を確認できたの

で、嗅神経への蓄積も考えられ、鼻腔細胞を回収して、PMCA 法で検査したが、#18、#19 ともに鼻腔洗浄細胞中の PrP^{Sc} は検出限界以下であった (図 4)。#19 の CSF については、投与後 4.5 年、4.8 年、5.0 年目のサンプルから連続して PrP^{Sc} が検出されたが、5.3 年目の CSF では検出限界以下となった。それ以外の体液類では検出されなかった (図 4 B)。

3) H-BSE 接種群の臨床経過

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種群 (#24、#25)、経口投与群 (#26、#27) は共に投与後 1.3 年を経過したが、神経及び精神症状共に異常はない (data not shown)。現在、経過観察中である。

D. 考察

BSE-P は、食品または輸血等を介しての水平感染リスクが取りざたされていることから、サルを用いての検証を試みた。経口投与モデルでは、C-BSE-P (#6、#9) は投与後約 13.5 年、L-BSE-P (#18、#19) は約 5.5 年を、輸血モデルでは、C-BSE-P (#12) は約 10.4 年を経過したが、発症は確認されなかった。C-BSE-P 投与サル (#6、#9、#12) は安楽死を行ったが、発症を確認できなかったこともあり、安楽死直後の脳 MRI 画像を見ても、BSE 脳内接種ザルの時のような脳室拡張を伴う脳萎縮等の異常所見は認められず、病態の進行を示す所見は得られなかった。また、脳内接種モデルでは、発症前から体液類中に PrP^{Sc} が検出されたが、#6、#9、#12 の体液類からはいずれも PrP^{Sc} は検出されなかった。以前、C-BSE-P を経口、輸血接種したサルを、それぞれ投与後 7.5 年目、4.8 年目に安楽死した際には、リンパ節等から PrP^{Sc} を検出されたが、今回、#12 の神経や末梢組織を同様に解析したが、調べた組織から PrP^{Sc} は検出限界以下であった。Lasmézas らのグループは C-BSE-P 経口接種実験でカニクイザル 2 頭中 1 頭の伝達を確認しているが、その時の投与脳組織重量は 5 g で、我々の投与脳組織重量 0.6 g の 8 倍以上にあたる。従って、投与量の問題により本実験系では伝達が難しかったのかもしれない。#12 は、C-BSE-P を脳内接種し、発症したサルの安楽死時に採取した末梢血を、体内循環血液の約 1/10 量に相当する 40 mL 輸血した個体である。輸血量としてはかなりの量であるが、そもそも血液中の PrP^{Sc} 量は極めて少なく、感染が成立しにくかった可能性があり、輸血サンプルの再確認が必要かもしれない。いずれにせよ、今後、今回安楽死した 3 頭の網羅的な解析を進める。

L-BSE 経口投与ザル (#18、#19) では、一時的

に唾液、血漿や CSF から PrP^{Sc} が検出されが、継続した検出は確認できなかった。L-BSE 脳内接種したサルでは、PrP^{Sc} は継続して検出が認められたので、感染ルートにより PrP^{Sc} の蓄積度合いが違う可能性が示唆された。経口投与の場合、蓄積が非常に微量のため、検出の有無に波があるのかもしれない。L-BSE-P 経口接種については、Mestre-Francé らのグループがカニクイザルなどの真猿類より下等な原猿類であるハイロネズミキツネザルでの伝播を報告しているが、ヒトに近い真猿類での報告はまだない。従って、カニクイザルによる経口伝播が確認されれば、よりヒトへの感染リスクが高まるので、慎重に解析を進めていく。C-BSE-P に比べ、L-BSE-P は脳内接種モデルでは種の壁を越えての伝播が容易で、ビルレンスが強い傾向であったが、脳組織重量 8g を経口投与しているにもかかわらず、現在のところ、発症していない。その理由として、真猿類では L-BSE-P の経口感染はしにくい可能性もあり、今後更なる解析が必要である。ウシやネズミキツネザルの経口投与実験では、症状が出にくいとの報告があり、サルにおいてもその傾向があるかもしれない。従って、#18、#19 は、まだ未発症ではあるが、近いうちに安楽死を行い、PrP^{Sc} の蓄積を網羅的に解析する予定である。

H-BSE-P の接種実験は、接種後 1.3 年を経過した。L-BSE 初代脳内接種モデルでは、潜伏期間は約 1.5 年であったので、H-BSE-P も L-BSE-P と同様なビルレンスであれば、そろそろ発症してもおかしくない時期を迎える。しかしながら、H-BSE-P はウシやウシ型 TG マウスを用いた脳内接種モデルでは、L-BSE-P に比べ潜伏期は長いとの報告があり、サルモデルでも L-BSE-P に比べれば、潜伏期は長いと推測している。

E . 結論

L-BSE 経口投与ザルは投与後 5.5 年を経過したが、2 頭とも発症は未だ認められていない。潜伏期に唾液、血漿、CSF から PrP^{Sc} が検出されたが、一過性であった。未発症ではあるが、近いうちに安楽死を行い、網羅的な解析を行い、ヒトに近い真猿類での L-BSE 経口感染リスクを評価する。

H-BSE 脳内接種、経口投与ザルは接種後 1.3 年を経過したが、発症は認められていない。引き続き、注意深く経過観察を行い、H-BSE-P も種の壁を越えた霊長類への感染の有無を確認する。

C-BSE 経口投与、輸血ザルは、それぞれ接種後 14.5 年、10.4 年経過したが、発症は未だ認められていないが、安楽死を行った。安楽死直後の脳の MRI 画像を見ても脳室拡張、萎縮は認められず、調べた経口投与ザルの神経、末梢組織から PrP^{Sc} は検出されなかった。引き続き網羅的な解析を行う。

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) Murayama Y, Ono F, Shimozaki N, and Shibata H. L-Arginine ethylester enhances *in vitro* amplification of PrP^{Sc} in macaques with atypical L-type bovine spongiform encephalopathy and enables presymptomatic detection of PrP^{Sc} in the bodily fluids. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Tokyo, Japan)
- 2) Hagiwara K, Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Shibata H, and Ono F. Interspecies transmission of atypical L-BSE prion to non-human primates (cynomolgus macaques) alleviates PrP^{Sc} glycoform profile of cattle L-BSE trait, but preserves incompetent transmissibility to inbred mice. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Tokyo, Japan)
- 3) 飛梅 実、萩原 健一、小野 文子、佐藤 由子、柴田 宏昭 . マカクを用いたBSE由来プリオンの実験的継代 . 第105回日本病理学会総会 (5月12-14日, 2016, 仙台、日本)

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

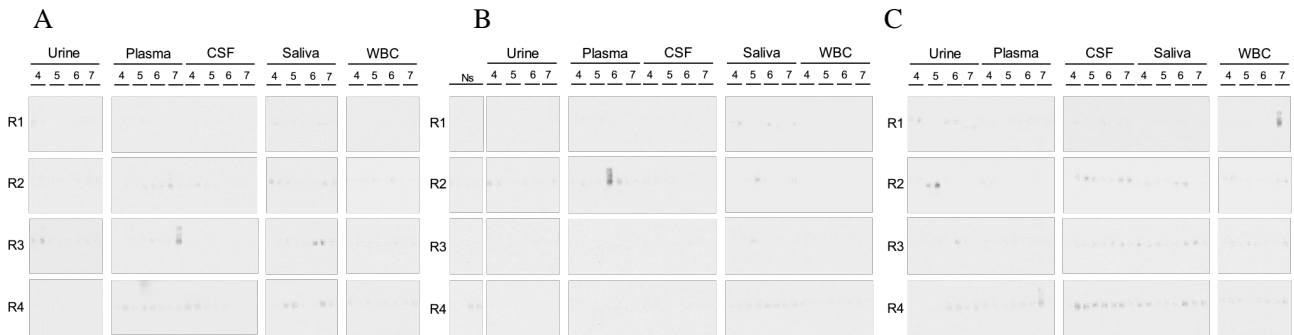


図 1 . C-BSE 接種ザルの体液類における PrP^{Sc} 検出結果

(A) 経口投与ザル (#5) の投与後 11.8 年 (4)、12.1 年 (5)、12.3 年 (6)、12.6 年 (7) に採材、(B) 経口投与ザル (#9) の投与後 11.7 年 (4)、12.0 年 (5)、12.2 年 (6)、12.5 年 (7) に採材、(C) 輸血ザル (#12) の 8.7 年 (4)、9.0 年 (5)、9.2 年 (6)、9.5 年 (7) に採材。各サンプルは duplicate で連続 PMCA により増幅した。増幅産物を PK 消化後、WB 法により検出した。Ns は No seed samples (4 lanes)。

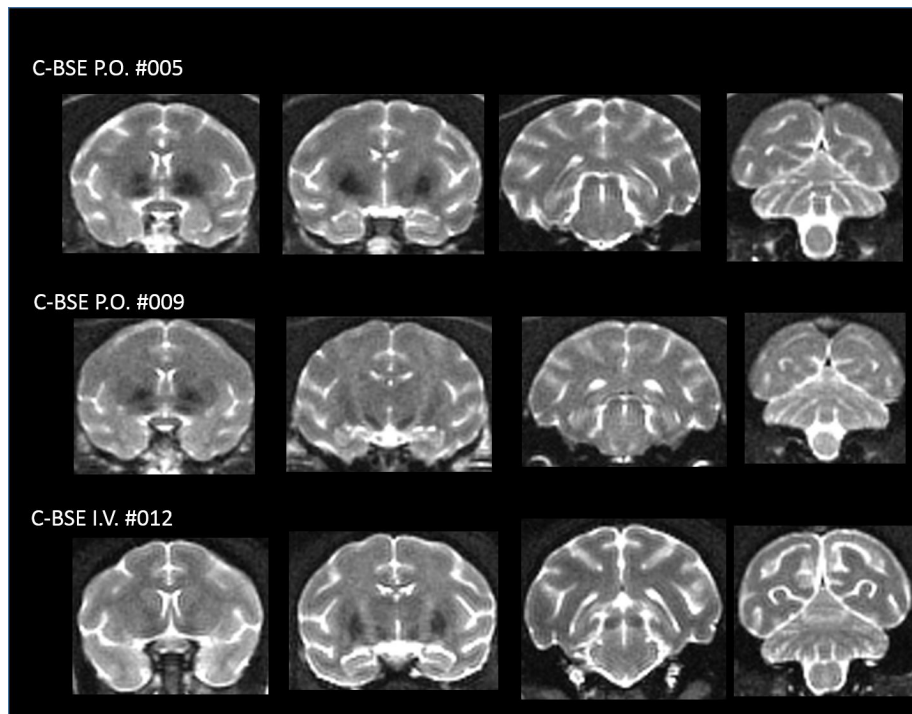


図 2 . 安楽死直後の C-BSE 接種カニクイザル脳の MRI 画像 (T2 強調画像)

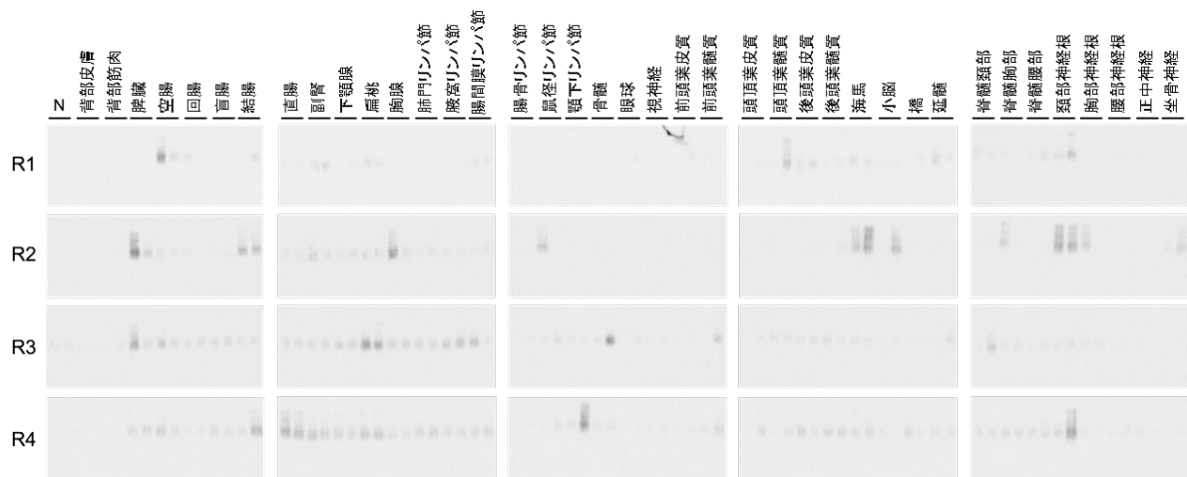


図3 . C-BSE 輸血ザル (#12) の各組織における PrP^{Sc} 検出結果

輸血後 10.2 年で安楽死後、各組織を採材し、10%乳剤を作製した。各サンプルを duplicate で連続 PMCA により増幅した。増幅産物を PK 消化後、WB 法により検出した。N は No seed samples (2 lanes)。

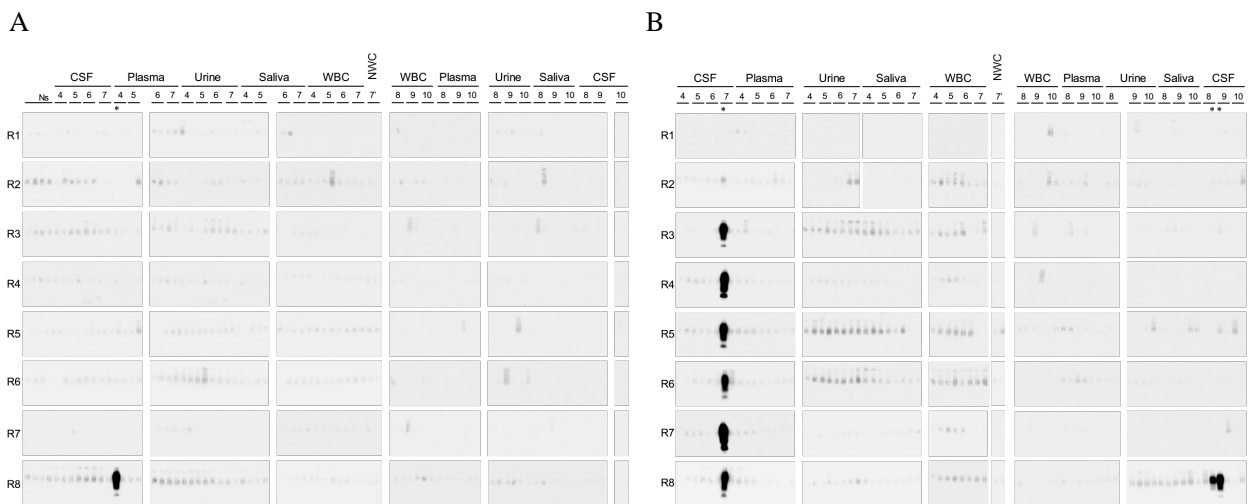


図4 . L-BSE 経口投与ザルの体液類における PrP^{Sc} 検出結果

(A) 経口投与ザル (#18) (B) 経口投与ザル (#19) の投与後 3.7 年 (4) 4.0 年 (5) 4.2 年 (6) 4.5 年 (7) 4.4 年 (7') 4.8 年 (8) 5.0 年 (9) 5.3 年 (10) に採材。各サンプルは duplicate で連続 PMCA により増幅した。増幅産物を PK 消化後、WB 法により検出した。NWC は鼻腔洗浄細胞。Ns は No seed samples (4 lanes)。

4 . 非定型BSE感染サルの神経病理学的解析

分担研究者 飛梅 実 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究協力者 佐藤 由子 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究要旨

定型 BSE (C-BSE) 由来プリオン接種サルではヒトでの変異型クロイツフェルトヤコブ病と同様の病態進行と、病理組織学的特徴を示す。本邦でも確認された非定型 BSE (L-BSE) のヒトへの感染事例は確認されていないが、サルモデルを用いてヒトへのリスク評価及びその推定される病原性、病理組織学的特徴を明らかにする。

A . 研究目的

定型 BSE (C-BSE) 由来プリオン接種サルではヒト変異型クロイツフェルトヤコブ病 (vCJD) と同様の病態進行と、病理組織学的特徴を示す。本邦でも確認された非定型 BSE (L-BSE) のヒトへの感染事例は確認されていないが、サルモデルを用いてヒトへのリスク評価及びその推定される病原性、病理組織学的特徴を明らかにすることを目的とする。

B . 研究方法

1) 本邦で確認された定型・非定型 BSE 感染ウシ由来プリオンを接種したカニクイザル脳組織を検討材料として用いた。定型 BSE 由来プリオンについては、BSE 罹患牛脳乳剤の経口投与ならびにプリオン発症サル (定型 BSE 脳内接種サル) 血液を輸血したサルを用いた。

2) 定型、非定型 BSE 由来プリオン接種後の各個体の病期の観察を行い、病期末期において安楽殺し、中枢神経系を含めた全身臓器を採取し病理学的検索を行った。経口投与群および輸血サル群においては、接種後の年数が経過したため、安楽殺後全身の病理学的検索を行った。

3) 中枢神経系組織に関し、定型、非定型由来プリオンの病理学的特徴を検索するため、パラフィン包埋切片に対し、HE 染色並びに抗プリオン抗体を用いたプリオン特異的な免疫染色を行い、病理学的変化ならびにプリオン沈着パターンの観察を行った。同時に、各プリオンの沈着パターンならびに病理学的特徴を他 TSE 疾患と比較するため、個々の特徴についての数値化についても検

討を行った。

(倫理面への配慮)

サルを用いた実験については予医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医学科学研究センターの指針を順守するとともに、動物愛護精神に基づき研究を行っている。

C . 研究結果

1) 定型(C) BSE 経口投与サルの解析

本邦で確認された定型 BSE (JP6) 脳乳剤を経口投与されたサルについて安楽殺後の病理学的検索を行った。経口投与群は脳内接種群の潜伏期 (~3年) に比べ長期間臨床症状を呈さなかった。投与後 10 年以上が経過したため、安楽殺後にプリオンの沈着の有無について検索した。結果、経口投与群の中枢神経系並びに末梢組織へのプリオンの沈着は認められなかった。HE 染色による検索においても、プリオン病を示唆する所見は得られなかった。(Fig. 1)

2) 定型(C) BSE 感染発症サル血液を用いた輸血感染実験

JP6 脳乳剤の脳内接種によりプリオン病を発症したサル (#7 初代脳内接種サル) 血液を輸血に供した。被輸血サルは経過観察中にプリオン病特徴的な臨床症状を呈さず、輸血後 8 年が経過したため安楽殺後に病理学的検索を行った。結果、経口投与群の中枢神経系並びに末梢組織へのプリオンの沈着は認められなかった。HE 染色による検索においても、プリオン病を示唆する所見は得られなかった。(Fig. 2)

3) 定型(C) BSE および非定型(L) BSE の脳内

接種サルではそれぞれ中枢神経系で特徴的な病理所見を呈する。C-BSE 接種サルではブランク型のプリオン沈着を特徴とし、空胞変性は軽度であった。これらの特徴は vCJD およびその水平感染例における病理学特徴と類似していた。(Fig. 3)一方、L-BSE 脳内接種サルでは C-BSE 接種サルとは大きく異なり高度の空胞変性とシナプスタイプのプリオン沈着を特徴とした。(Fig. 4)これら特徴を抽出し数値化を行ったところ、C-BSE 感染サルでの空胞変性は L-BSE に比べ、数、大きさ共に小さいことが明らかとなった。(Fig. 5)また、既存のヒトプリオン病と比較したところ、L-BSE 由来プリオン感染サルの病理組織像は sCJD との類似点が多く、病理組織のみの検索では鑑別が難しいことが明らかとなった。(Fig. 6)

D . 考察

経口および輸血による感染実験では C-BSE 由来プリオンの伝播を病理学的に確認できなかった。原因は他グループで成功している例に比べ投与量が少なかったことが挙げられる。輸血にはプリオン病発症サル血液を用いた。これまでの研究で C-BSE 脳内接種サルでは中枢神経系以外の組織にプリオンの蓄積を病理学的に確認できていない。脳内接種サル血液を用いた感染実験においてもプリオンの伝播が確認できなかったことから、脳内接種では血液中にもプリオンは存在しないか、あっても微量でありこれまでの実験結果を肯定する結果となった。ヒトプリオン病で脳での高度の空胞変性とシナプス型のプリオン沈着を示す病型は sCJD であり、これはヒトプリオ

ン病の中で大部分を占める。病理組織検索のみでは L-BSE 由来プリオン病と sCJD を鑑別することは難しく、生化学的検査の必要性が示唆された。

F . 健康危険情報

記載事項無し

G . 研究発表

1 . 論文発表

該当なし

2.学会発表

1) 飛梅 他、Experimental passages of BSE-derived prion in Macaques. 第 105 回日本病理学会総会 (仙台、2016.5 月)

2) 飛梅 他、Pathological analysis of C and L BSE derived prion in Macaques. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016.10 月 札幌)

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

記載事項なし

2 . 実用新案登録

記載事項なし

Fig. 1

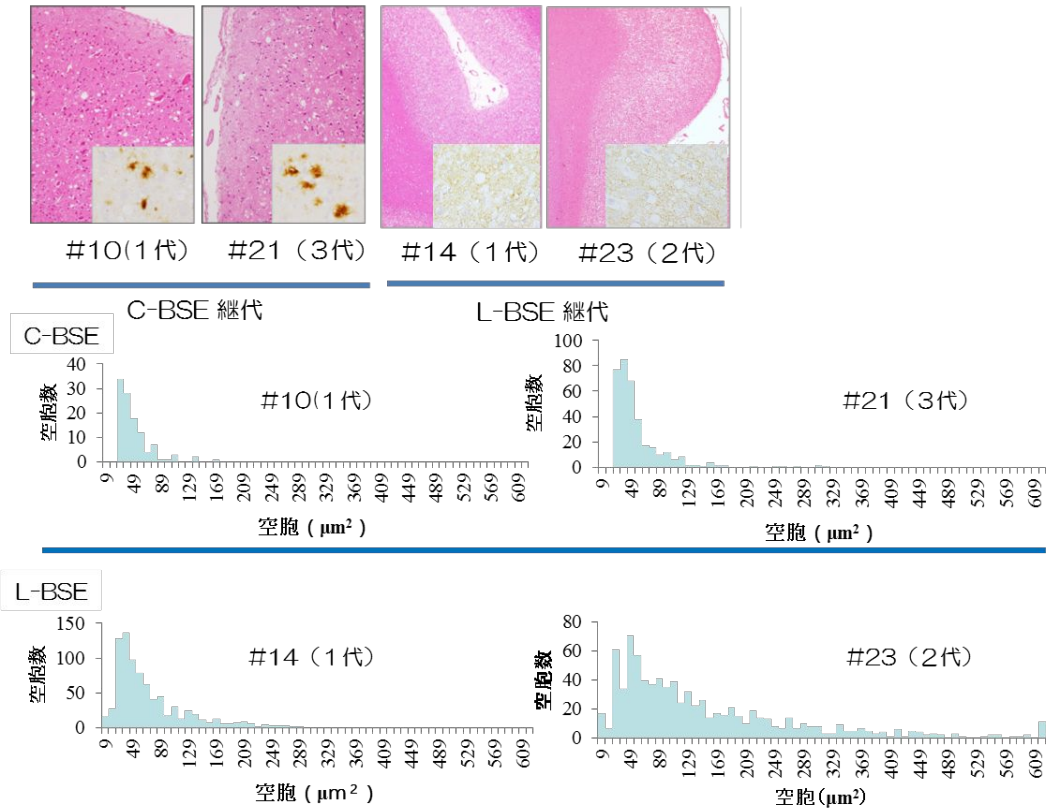
Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

プリオン種特徴的な病理像の数値化



頭頂葉大脳皮質0.25²cm (任意の部位4カ所の合計) の空胞変性数、大きさの分布
 C-BSE接種サルの大脳皮質では空胞変性は顕著ではなく、比較的小型の空胞が多い。
 一方、L-BSE接種サルでは高度の空胞変性を認め、大型の空胞が形成される。この傾向は継代によっても維持される。

Fig. 6

ヒトプリオン病とサルを用いたBSE感染実験の比較

Prion Disease	sCJD MM1	GH-CJD rapid	GH-CJD slow	dCJD	Kuru	vCJD	C-BSE ic Macca	L-BSE ic Macca
Disease Duration (months)	3.9	4	14	4	17	18	~12	~10
Incubation Time (year)		6	38	~20	~50	9		
Codon 129	Met/Met	Met/Met	Met/Met	Met/Met		Met/Met	Met/Met	Met/Met
PrP IHC Cerebrum (Kuru)	-	-	+	-	+	+	+	-
PrP IHC cerebellum	Brush stroke-like	Brush stroke-like	Kuru + Brush stroke-like	Brush stroke-like	Kuru +/- @ granular layer	Kuru + Brush stroke-like	Kuru + Brush stroke-like	Kuru + Brush stroke-like

5. C型およびL型BSE プリオンの蛋白質化学的な比較解析

分担研究者 萩原 健一（国立感染症研究所 細胞化学部 第1室室長）

研究協力者 柴田 宏昭（医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター）

小野 文子（千葉科学大学）

岩丸 祥史（動物衛生研究所 インフルエンザ・プリオン病研究センター）

飛梅 実（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨

本年度は、食肉衛生試験所等でのBSEスクリーニングによって摘発したBSEプリオン陽性ウシ脳（JP6, JP10, JP24）および本研究班の研究リソースとして開発してきたBSEプリオンを伝播させたカニクイザルおよびマウスの脳を材料として、従来とは異なる熱化学的なアプローチにより、C-（従来型）BSEプリオンとL-（非定型）BSEプリオンのPrP^{Sc}の生化学特性について調べた。その結果、L-BSEプリオンについては、或るpHおよび温度を境としてPrP^{Sc}のプロテアーゼ（protease Kやpapain）に対する抵抗性が大きく変わることがわかった。一方、C-BSEプリオンのPrP^{Sc}は調べた範囲のpH・温度ではプロテアーゼへの抵抗性を維持していたが、通常の消化条件（37℃）と高温消化条件では、プロテアーゼ抵抗性のPrP^{Sc}断片のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での泳動度が異なることを見出した（この泳動度のシフトは再現的に観察されたが、シフトを生じるのが熱負荷が必要十分なのか、実験上の他の操作も関与しているのか、未だ把握できていない）。また本年度は、ウシからカニクイザルへの脳内接種による伝播実験において、カニクイザルへの異種動物間伝播を経てもC型・L型BSEプリオンのウイルス学的特性が変わらないことを、マウスへの伝播能を指標として示した。さらに前年度からの継続課題である本邦のBSEスクリーニング検査で使用中の迅速BSE検査キットの非定型L-/H-BSE罹患ウシの摘発への有効性を確認した。

A. 研究目的

以下の1) 2) 3) を目的とした。

1) 熱化学的なアプローチによるC型およびL型BSEプリオンの蛋白質化学的な比較解析

C-BSEプリオンやL-BSEプリオンが、ウシから異種動物への伝播に伴い、そのウイルス学的特徴や生化学特徴に変化や修飾が起こるのかという点を検討することは、プリオン株の起源や新たなプリオン株の出現を考察・予測する上で意義深い。

C型BSEプリオンとL型BSEプリオンは、ウシから異種動物（カニクイザル、マウス）への実験的伝播を経た後でも両者のウイルス学的・病理学的な特徴の相違が保たれていることが、これまでの本研究班の研究から示されている。他方、PrP^{Sc}の生化学的な特徴に関しては、ウシ脳で認められるC型とL型の糖鎖型の異なる特徴が霊長

類モデルであるカニクイザルへの伝播後では明瞭ではなくなることが、本研究班の研究からわかった。また、protease K (PK) 濃度に依存したPrP^{Sc}の抵抗性を調べると、ウシ脳のC型は高濃度のPKに対して抵抗性をもつが、カニクイザルへの伝播後ではC型の抵抗性が低下して両者がほぼ同等・中度の抵抗性を示すようになることが昨年度までの検討からわかってきた。

そこで今回、PrP^{Sc}の生化学的特徴を新たな切り口から検討することを目的として、従来とは異なる熱化学的なアプローチによる比較を行う。

2) カニクイザルで増殖するC-/L-BSEプリオンの特性変化の有無の検証

前項1)の冒頭で述べたように、ウシから霊長類モデルであるカニクイザルへC型およびL型

BSE プリオンが伝播した後にプリオンの性状が変化するか否かという点は、畜産物（食品、医薬品原料、等）を介したヒトに対する BSE プリオンのリスク予測やヒト・プリオン病の診断・対策の上で今後も重要であると思われる。この点に資する知見を得ることを目的として、ウシ脳の C-および L-BSE プリオン、および感染カニクイザルで増殖した C-および L-BSE プリオンをそれぞれマウスへ脳内接種し、カニクイザルへの伝播によってプリオンの性状に変化が誘起されるかという点についてマウスのバイオアッセイによる検討する。

3) 食肉衛生検査所等での BSE スクリーニングに使用されている迅速 ELISA キットの性能評価
本邦の BSE スクリーニング検査で使用中の迅速 BSE 検査キットの非定型 L-/H-BSE 罹患ウシの摘発への有効性を確認する。

B. 研究方法

1) BSE プリオン陽性ウシ脳 (JP6, JP10, JP24) ホモジネートまたは BSE プリオンを伝播させたカニクイザルおよびマウスの脳ホモジネートを 2% Zwittergent 3-14 / 0.5% sarkosyl を含む 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5 @24°C) または 50mM PIPES 緩衝液 (pH6.8 @24°C) または 50mM HEPPS 緩衝液 (pH8.2 @24°C) 中で、37 ~ 78°C の温度設定下で PK (Roche 社、recombinant、終濃度 40µg/ml) または papain (Worthington 社、終濃度 0.4unit/ml) により 30min 間消化した。消化反応液に 1 倍容の 5mM PMSF を含む butanol/methanol (5/1, v/v) を添加後、16,000xg で 15min 遠心して得られる沈殿物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、抗プリオン蛋白質抗体を用いるウエスタンブロット法により、PK または papain 抵抗性の PrP^{Sc} 断片を検出した。

2) C-BSE プリオンおよび L-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播がプリオン株の性状の変化を誘起し得るかを調べるため、C57BL/6J マウスへ 2 代継代させた場合、すなわち、ウシ マウス (初代) マウス (2代) ならびにウシ カニクイザル マウス (初代) マウス (2代) の潜伏期間の異同を調べる。6 週齢の C57BL/6J () に対して、初代伝播マウスの脳ホモジネートを脳内接種した。接種に際し、接種材の PK 消化物をウ

エスタンブロットにかけ、検出される PrP^{Sc} のバンドが同強度になるように接種量を調整した。

3) 昨年度までに迅速試験キットの陰性ウシ検体および C-, L-, H-BSE 陽性ウシ検体に対する反応性を調べた。各キットにおいて、3 種の BSE プリオンに対して反応性に優劣があるかを判断するため、各検体を PK 消化後にウエスタンブロット分析にかけ、PrP^{Sc} 含有量を定量した。

(倫理面への配慮)

プリオンの取扱いは、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定が定める規定および指針を遵守した。マウスへの感染実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1) BSE 患者として摘発したウシの脳ホモジネートについて、L 型 BSE ウシは pH8.2 (pH は 24°C での値であり、68°C の実測値は pH7.6 となった; 文献によれば $dpK_a/dT = -0.014/^\circ C$ となっており、実測値は文献値に合致した) 68°C での papain 消化により、ウエスタンブロットにより検出される PrP^{Sc} のプロテアーゼ抵抗性断片が消失した。文献およびペプチド基質を用いた実験から、papain の酵素活性は pH8.2 よりも pH6.8 の方が高いが、pH6.8 では L 型 PrP^{Sc} のプロテアーゼ抵抗性断片は残存して検出された [図 1]。一方、C 型 PrP^{Sc} は今回調べた範囲の pH・温度ではプロテアーゼへの抵抗性を維持していたが、通常の消化条件 (37°C) と高温消化条件では、プロテアーゼ抵抗性の PrP^{Sc} 断片の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での泳動度が異なることを見出した [図 1]。しかし、この泳動度のシフトはウシ脳の C-BSE プリオンでは明瞭に認められたが、C-BSE プリオンを異種動物 (カニクイザルやマウス) へ伝播・馴化させるとシフトは判別困難となった。2) C57BL/6J マウスへ 2 代継代することにより、異種動物間 (ウシ マウス、またはカニクイザル マウス) の初代伝播に見られる種の壁の影響を排除した。実験の結果、カニクイザルへの伝播の有無に依らず、C-BSE プリオンのマウス 2 代目伝播での潜伏期は同等だった [図 2]。すなわち、マウスのバイオアッセイを指標とするかぎり、カ

ニクイザルへの伝播によって C-BSE プリオンのウイルス学的特性に明らかな変化が誘起されることは無いと考えられる結果が得られた。L-BSE プリオンについては、以前の本研究班の研究において、ウシから C57BL/6J マウスへの伝播は初代・2 代目接種実験ともに伝播不能という結果が得られている。今回、カニクイザルへ伝播後の L-BSE プリオンをマウスへ脳内接種したが、マウスへの初代・2 代目ともに伝播に成功していない(現在、2 代目マウスは接種後 250 日であり経過観察を継続中)。おそらく、L-BSE プリオンも、カニクイザルへの伝播によってそのウイルス学的特性に明らかな変化が誘起されることは無いと考えられる。

3) 本邦の主要 BSE 検査キット 3 点 (TeSeE、フレライザ、ニッピール) について、欧州およびカナダでの検査キットの評価試験に準じた方法で、その有効性の検証を行った。その結果、各キットは、C-BSE 罹患ウシのみならず、L-BSE 罹患ウシの摘発にも有効であった。更に、現行唯一の国内検査キットであるニッピールは、H-BSE 罹患ウシの摘発にも有効であった。

また、キット間に検出感度の優劣は認められたが、EFSA の求める基準を満たすと判断された。個々のキットは C-、L-、H-BSE プリオンを優劣無く検出した。ニッピールの検出感度は十分に高く、その検出能は欧州で評価試験が行われた Beta Prion キットをわずかに下回るレベルであることが明らかになった [表 1]

D. 考察

ウシ脳に蓄積した C-BSE と L-BSE プリオンの PrP^{Sc} は、proteinas K 消化に対する抵抗性が異なることが知られている。今回、熱負荷をかけた条件でウシ脳ホモジネートを papain による消化にかけたところ、C-BSE プリオンは、papain 消化に抵抗性の PrP^{Sc} 断片が検出されたのに対し、L-BSE プリオンは pH8.2、68 °C での消化により、PrP^{Sc} 断片が消失した。papain の酵素活性が高い pH6.8 では L 型 PrP^{Sc} のプロテアーゼ抵抗性断片は残存しているため、PrP^{Sc} 断片の消失は papain の活性亢進よりも、pH8.2、68 °C で L-BSE プリオンに構造緩和が惹起されるためであると推測される。また C-BSE プリオンについては、通常の消化条件 (37 °C) と高温消化条件では、プロテアーゼ抵抗

性の PrP^{Sc} 断片の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での泳動度が異なることを見出した。この泳動度のシフトは再現的に観察されたが、シフトを生じるのが熱負荷で必要十分なのか、実験上の他の操作も関与しているのか、未だ把握できておらず、今後の検討課題である。このようにメカニズムは不明であるが、本実験条件を生かせば、ウシ C-BSE プリオンの判別法として有用なのではないかと思われる。また、新たに生じた PrP^{Sc} 断片が、通常の消化条件で得られる PrP^{Sc} 断片とは異なる病原性を有するののかという疑問については、今後、検証したい。

また、今回のマウスのバイオアッセイを指標とするかぎり、カニクイザルへの伝播によって C-および L-BSE プリオンのウイルス学的特性に明らかな変化が誘起されることは無いと考えられる。カニクイザルでの伝播実験をそのままヒトへ適用するのは注意を要するが、本研究結果はヒト・プリオン病の診断を考慮する上で意義深い。

E. 結論

熱を負荷したプロテアーゼ消化 (papain 消化) を行い、L-BSE プリオンの蛋白質化学に新たな一面を発見した。この実験は、C-および L-BSE プリオンの熱安定性を調べるべく行ったが、当初予想していなかった C-BSE プリオンの PrP^{Sc} 断片の電気泳動シフトという現象を確認した。

ウシから霊長類モデルであるカニクイザルへ、異種動物間伝播させた C-BSE および L-BSE プリオンの特性について、マウスのバイオアッセイを指標に検討し、研究目標を達成した。

また、本邦の迅速 BSE 検査キットについての評価試験を行い、当該の検査キットが C-、L-、H-BSE 罹患ウシを適切に摘発できることを示した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表

1) Hagiwara, K., Sato, Y., Yamakawa, Y., Hara, H.,

Shibata, H. and Ono, F. Interspecies transmission of atypical L-BSE prion to non-human primates (cynomolgus macaques) alleviates PrP^{Sc} glycoform profile of cattle L-BSE trait, but preserves incompetent transmissibility to inbred mice. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Tokyo, Japan)

- 2) 飛梅実、萩原健一、小野文子、佐藤由子、柴田宏昭. マカクを用いた BSE プリオンの実験的継代 . 第 105 回日本病理学会総会 (2016 年 5 月 12-14 日、仙台)
- 3) Tobiume, M., Sato, Y., Hagiwara K., Shibata, H.,

Ono, F. and Hasegawa H. Pathological analysis of C- and L-BSE derived prion in Macaques. 第 64 回日本ウイルス学会 (2016 年 10 月 23-25 日、札幌)

H . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得
無し
- 2 . 実用新案登録
無し

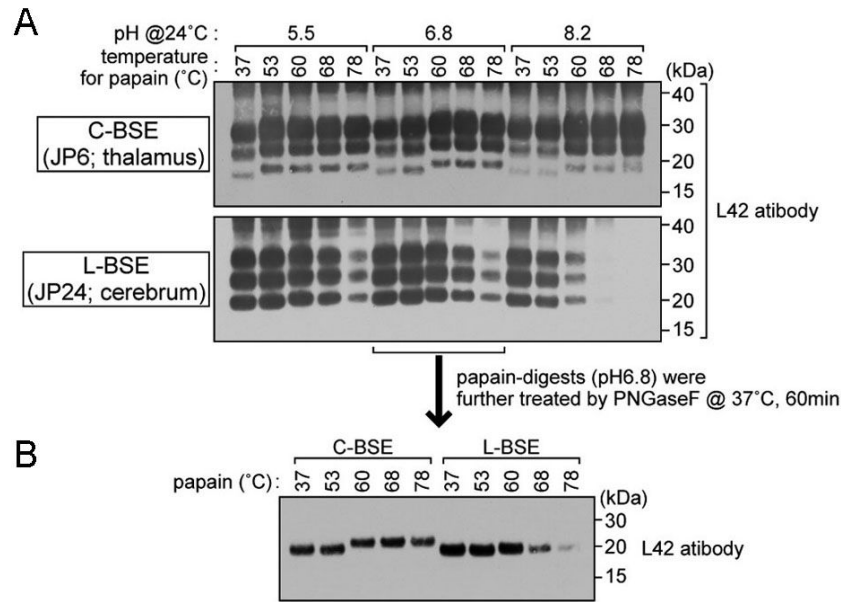


図1 (A)異なる pH、温度条件下での、C-BSE ウシ (JP6) と L-BSE ウシ (JP24) 脳ホモジネートの papain 消化物のウエスタンブロット分析。L-BSE ウシ脳ホモジネートでは、pH8.2・68°C の消化条件で、PrP^{Sc} が検出されない。(B) pH6.8 での papain 消化物を PNGaseF 処理後にウエスタンブロット分析にかけた。C-BSE ウシ脳ホモジネートでは、60°C 以上の消化条件で L42 抗体陽性のバンドが上方シフトする。

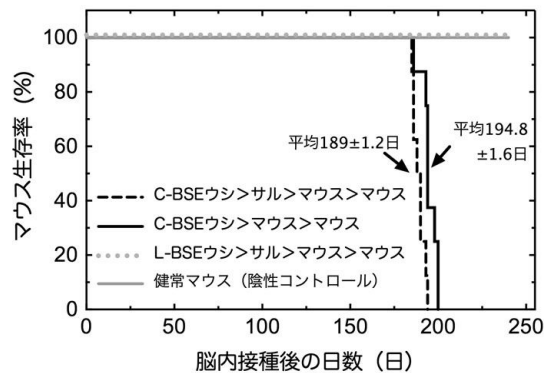


図2 C-BSE プリオンをウシ (JP6) から C57BL/6J マウスへ 2 継代させた場合 (2 継代目; 黒実線) と、ウシからカニクイザルへ伝播後に C57BL/6J マウスへ 2 継代させた場合 (2 継代目; 黒点線) は、発症経過が同じだった。また、L-BSE プリオンをウシ (JP24) から C57BL/6J マウスへ接種してもプリオンの増殖・個体の発症が認められない結果を本研究班で既に得ているが、今回、ウシからカニクイザルへ伝播させた L-BSE プリオンを C57BL/6J マウスへ接種したところ (灰点線) やはりプリオンの増殖・個体の発症が認められない。このようなマウスへの病原性を指標とすると、カニクイザルで増殖した C-/L-BSE プリオンの特性は、ウシで増殖した C-/L-BSE プリオンの床性と変わらないと考えられる。

表 1 本邦で使用されてきた迅速BSE検査キットの評価

test kit	C-BSE		L-BSE		H-BSE		normal brain	tissues (mg /well ^{c)}
	detection limit	positives at detection limit ^{a)}	detection limit	positives at detection limit ^{a)}	detection limit	positives at detection limit ^{a)}	positive wells / total numbers of wells ^{b)}	
NippiBL [®] ^{d)}	1:256	3	1:8	3	1:16	3	0 / 28	10
	1:256	3	1:16	3				
TeSeE [®] (standard protocol)	1:16	3	1:2	2 ^{e)}	NT ^{f)}	-	0 / 12	33
FRELISA [®]	1:64	3	1:8	3 ^{g)}	NT	-	0 / 7	33
BetaPrion [®]	1:1024	3	1:64	2	NT	-	0 / 12	28

a) The number of wells in triplicate that showed positive signals at the detection limits.

b) Evaluation of the kits was carried out with sets of serially diluted positive samples and normal brain samples.

c) Weights of tissues that were processed and applied to a single well according to the manufacturers' protocols.

d) Two independent tests were carried out for C-BSE and L-BSE samples *t* respectively.

e) One well was positive *t* and one well was pseudo-positive (i.e. *t* the absorbance was between the threshold of positivity and [threshold - 10%] value).

f) Not tested.

g) Two samples were positive *t* and one sample was pseudo-positive (i.e. *t* the absorbance was between the threshold of positivity and [threshold - 10%] value).

6. プリオン感染および非感染動物脳組織における抗 PrP マウスモノクローナル抗体 132 と 8D5 の反応性

分担研究者 長谷部 理絵 北海道大学大学院 獣医学研究科 講師

研究要旨

昨年度までに確立した異なるエピトープを認識する 2 種の抗 PrP マウスモノクローナル抗体 (mAb) 132 と 8D5 を用いた PrP^{Sc} 特異的免疫染色法の応用性を検討するために、牛およびウシ PrP 過発現トランスジェニック(Tgbov)マウス脳組織における両抗体の反応性を検討した。L 型 (L-) BSE 感染 138 日目の牛脳組織では mAb8D5 により橋に線維状のシグナルが検出され、橋、視床および視床下部の少数の細胞の細胞質にもシグナルが検出された。非感染牛脳組織でも同様のシグナルが検出されたため、牛脳組織の特定の領域では PrP^C と PrP^{Sc} の区別が困難である可能性が示唆された。感染および非感染牛脳組織において mAb132 のシグナルは認められなかったが、感染 138 日目では PrP^{Sc} の蓄積が十分でなかったと考えられるため、mAb132 については異なる感染時期での検討が必要であると考えられた。非感染 Tgbov マウスの脳では嗅球の一部に mAb132 の強いシグナルが認められたが、これは BSE 感染 Tgbov マウスでの PrP^{Sc} のシグナルと区別ができなかった。海馬にも mAb132 により弱いシグナルが認められたが、PrP^{Sc} のシグナルと区別が可能であった。mAb8D5 による染色では、非感染 Tg マウスの脳全域に弱いシグナルが認められたが、感染マウスでの PrP^{Sc} とは区別が可能であった。

A. 研究目的

プリオン感染動物の脳組織における PrP^{Sc} の検出方法としては、パラフィン包埋切片の免疫組織化学染色やパラフィン組織プロットが用いられてきた。しかしながら、これらの方法では前処理として高压蒸気処理やプロテアーゼ (PK) 処理が必要であり、この過程で組織が傷害を受けることにより、全ての PrP^{Sc} 分子種を検出できていない可能性が考えられる。mAb132 はマウス PrP の 119-127 番目のアミノ酸を認識し (Kim et al., Virology 2004)、PK 処理なしにグアニジンチオシアン酸 (GdnSCN) の前処理により、培養細胞とプリオン感染マウス脳組織で PrP^{Sc} を PrP^C と区別することができる (Yamasaki et al., J Gen Virol. 2012; Sakai et al., J Virol. 2013)。また、mAb8D5 はマウス PrP の 31-39 番目のアミノ酸を認識し、感染動物の脳より PrP^{Sc} を免疫沈降することができ、初代培養神経細胞において前処理なしに PrP^{Sc} を PrP^C と区別することができる (Masujin et al., PLoS One. 2013; Tanaka et al., J Gen Virol. 2016)。昨年度までにプリオン感染マウス脳組織凍結切片を用いて、これらの抗体による PrP^{Sc} 特異的免疫

染色法を確立した。今年度は同方法の牛脳組織およびウシ PrP を過発現する Tgbov マウス脳組織凍結切片への応用の可能性について検討した。

B. 研究方法

1) 脳組織凍結切片の作製

L-BSE 感染 138 日目の牛 2 頭の脳組織 (視床、視床下部、橋) は北海道立畜産試験場 福田 茂夫博士より分与された。正常牛 (ホルスタイン種、19 ヶ月齢、雄) 2 頭の脳組織 (視床、視床下部、橋) は北海道畜産公社 早来工場より分与された。BSE 感染および非感染 Tgbov 脳組織は農研機構動物衛生部門 岩丸 祥史博士、松浦 裕一博士より分与された。免疫染色の陽性対照として Obihiro 株感染 ICR マウス脳組織を、陰性対照として非感染 ICR マウス脳組織を用いた。凍結材料はクリオスタットを用いて 10 μm の厚さに薄切した。

2) 蛍光標識 mAb132 と mAb8D5 の調整

mAb132 と 8D5 は先行論文に従って調整した (Kim et al., Virology 2004, Masujin et al., PLOS ONE

2013)。Alexa Fluor 488 および 647 標識 mAb132 は、Alexa Fluor 488 または 647 Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific)を、Alexa Fluor 555 標識 mAb555 は、Alexa Fluor 555 Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて調整した。アイソタイプ抗体として抗パルボウイルス mAb P2-284 を用いた。

3) mAb132 と mAb8D5 による免疫染色

組織切片を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) により室温で 10 分間固定した。0.1M Glycine-PBS を室温で 10 分間反応させたのち、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) により洗浄した。mAb132 による染色では、2.5M GdnSCN を室温で 15 分間反応させた。PBS による洗浄後、5%牛胎仔血清 (FBS) -PBS により室温で 30 分間ブロッキングし、Alexa Fluor 標識 mAb132 または mAb8D5 を 0.5% FBS-PBS 中 2 µg/ml に調整し、4 時間で 1 晩反応させた。PBS 洗浄後、4',6-Diamidino-2-Phenyl-indole (DAPI) で核を染色し、封入した。mAb132 と mAb8D5 の二重染色では、mAb8D5 により染色後、4%PFA により室温で 10 分間固定した。0.1M Glycine-PBS を室温で 10 分間反応させたのち、PBS 洗浄した。5%FBS-PBS により室温で 30 分ブロッキングし、mAb132 を反応させた。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1) 牛脳組織での mAb132 と 8D5 の反応性

mAb132 と 8D5 による PrP^{Sc} 特異的免疫染色は、培養細胞およびマウス脳組織に使用可能である。同方法が牛脳組織にも応用可能であるかを検討するために、L-BSE 感染牛脳組織と正常牛脳組織に対する mAb132 と 8D5 の反応性を比較した。L-BSE 感染牛脳組織では、mAb8D5 により橋に線維状のシグナルが検出され、橋、視床、視床下部の少数の細胞の細胞質に均質なシグナルが検出された (図 1A)。これらのシグナルは正常牛脳組織でも同様に観察された (図 1A)。mAb132 によるシグナルは認められなかった (図 1B)。

2) Tgbov 脳組織での mAb132 と 8D5 の反応性

mAb132 は bivalent 抗体であり、エピトープが複数存在することで結合性が強くなる (Suzuki et

al., 投稿準備中)。Tgbov 脳組織では、ウシ PrP が過発現しているため、バックグラウンドのシグナルが高くなり、PrP^C と PrP^{Sc} の区別が困難となる可能性が考えられた。そのため、非感染と BSE 感染 Tgbov の脳組織における mAb132 と 8D5 の反応性を比較し、PrP 過発現系においてもこれらの抗体による PrP^{Sc} 特異的免疫染色が使用可能であるかを検討した。非感染 Tgbov の脳組織では mAb132 により嗅球の一部に強いシグナルと海馬に弱いシグナルが検出された (図 2A)。これらを BSE 感染 Tgbov のシグナルと比較すると、嗅球のシグナルは区別ができなかったが、海馬のシグナルは感染 Tgbov の PrP^{Sc} のシグナルと区別が可能であった (図 2A)。mAb8D5 により非感染 Tgbov の脳組織では、非感染 ICR と比較して、脳全体にバックグラウンドのシグナルが強い傾向にあったが、BSE 感染 Tgbov 脳組織と比較すると、PrP^{Sc} のシグナルとの区別が可能であった (図 2B)。

3) mAb132 と 8D5 の二重染色による PrP^{Sc} 検出

mAb132 と 8D5 は異なるエピトープを認識するため、二重染色により異なる PrP^{Sc} 分子種を検出することができる (Tanaka et al., J Gen Virol.2016)。BSE 株による PrP^{Sc} 分子種相違を比較するため、定型 (C-)、H 型 (H-)、L 型 (L-) BSE 感染 Tgbov マウスの脳組織において、mAb132 と 8D5 の二重染色により PrP^{Sc} を検出した (図 3)。H-および L-BSE 感染 Tgbov マウス脳組織で検出される PrP^{Sc} は、大部分が mAb132 と 8D5 双方により検出された。病末期の C-BSE 感染 Tgbov マウスの橋の線維状からブラク状の PrP^{Sc} は mAb132 と 8D5 双方で検出されたが、顆粒状の PrP^{Sc} は mAb132 のみでシグナルが検出された。

D. 考察

牛脳組織で mAb8D5 により検出された線維状および細胞質に均質なシグナルは、感染、非感染に関わらず観察された。このことから、mAb8D5 は脳の特定の領域に存在する PrP 分子種または何らかのタンパク質に反応するものと考えられ、牛脳組織では mAb8D5 による PrP^C と PrP^{Sc} の区別が困難である可能性が示唆された。一方で mAb132 によるシグナルは感染、非感染牛脳組織ともに認められず、牛脳組織に発現する PrP^C やその他のタンパク質への反応性が低いことが示唆された。

PrP^{Sc} のシグナルも認められなかったが、これは L-BSE 感染 138 日目では PrP^{Sc} が十分に蓄積していなかったためと考えられる。mAb132 による PrP^{Sc} 特異的染色については、異なる感染時期の牛脳組織を用いて染色性を検討する必要がある。

Tgbov マウスの脳組織では、嗅球の mAb132 によるシグナルは PrP^{Sc} との区別が困難であった。mAb132 による染色では、非感染 Tgbov の海馬に、mAb8D5 による染色では脳組織全体に弱いシグナルが検出されたが、非感染 ICR マウスではこのようなシグナルが検出されないため、PrP 過発現による影響と考えられた。しかし、BSE 感染 Tgbov で検出される PrP^{Sc} と比較するとシグナル強度が弱かった。従って、Tgbov マウス脳組織でも mAb132 と 8D5 を用いた PrP^{Sc} 特異的免疫染色により、PrP^C と PrP^{Sc} の区別は可能であると考えられた。

mAb132 と 8D5 により、C-BSE 感染末期の Tgbov マウスの橋に蓄積する顆粒状 PrP^{Sc} は 8D5 により検出されず、N 末端が欠損している可能性が示唆された。一方で同時期の C-BSE 感染マウスの脳で検出される線維状およびプラーク状の PrP^{Sc} は 8D5 により検出されることから、C-BSE 感染 Tgbov マウスに蓄積する PrP^{Sc} の中には異なる分子種が混在する可能性が示唆された。

E . 結論

mAb132 による PrP^{Sc} 特異的免疫染色は、牛の脳組織及び PrP 過発現マウスでも応用可能であることが示唆された。mAb8D5 による染色は牛の脳組織への適用は困難であるかもしれないが、PrP 過発現マウスには応用可能であることが示唆された。また、mAb132 と 8D5 を用いた二重染色により、プリオン株や感染時期による PrP^{Sc} 分子種の相違を解析することができるかもしれない。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Hasebe, R., Tanaka, M., Suzuki, A., Yamasaki, T., and Horiuchi, M. Complement factors alter the

amount of PrP^{Sc} in primary-cultured mouse cortical neurons associated with increased membrane permeability. *Virology*, 496: 9-20, 2016.

- 2) Tanaka, M., Fujiwara, A., Suzuki, A., Yamasaki, T., Hasebe, R., Masujin, K., and Horiuchi, M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and primary-cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. *J Gen. Virol.*, 97: 2030-2042, 2016.
- 3) Shan, Z., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and 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*, 10: 305-318, 2016.

2.学会発表

- 1) Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion-infected mouse brain by flowcytometry. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Chiyoda-ku, Japan)
- 2) Kuroda, M., Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Transcriptome analysis of microglia and astrocytes in prion-infected mice. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Chiyoda-ku, Japan)
- 3) Tanaka, M. Fujiwara, A., Suzuki, A., Yamasaki, T., Hasebe, R., Masujin, K., and Horiuchi, M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and primary-cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. Prion2016 (May, 10-13, 2016, Chiyoda-ku, Japan)
- 4) 田中 美咲, 舛甚 賢太郎, 山崎 剛士, 長谷部 理絵, 鈴木 章夫, 堀内 基広. 異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) 特異的染色法によるプリオン持続感染株化細胞とプリオン感染初代培養神経細胞における PrP^{Sc} の解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (2016 年 9 月 6-8 日, 藤沢, 神奈川県)
- 5) 黒田 弥乃梨, 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. 次世代シーケンサーを用いた、プリオン感染マウス脳由来ミクログリアおよびアストロサイトの活性化状態の解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (2016 年 9 月 6-8 日, 藤沢, 神奈川県)
- 6) Yamasaki, T., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi,

M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion-infected mouse brain by flowcytometry. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016 年 9 月 23-25 日, 札幌, 北海道)

- 7) Kuroda, M., Yamasaki, T., Hasebe, R., Suzuki, A. and Horiuchi, M. Analysis of activation state of microglia and astrocytes in prion-infected mice by RNA-sequencing. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016 年 9 月 23-25 日, 札幌, 北海道)
- 8) Suzuki, A., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Utility of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CWD prions by RT-QuIC.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016 年 9 月 23-25 日, 札幌, 北海道)

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. L-BSE 感染および非感染牛脳組織における mAb8D5 (A) と mAb132 (B) の反応性. 赤: mAb8D5. 青: 核.

図 2. BSE 感染および非感染 Tgbov 脳組織における mAb132(A) と mAb8D5 (B) の反応性. (A) 非感染および L-BSE 感染 167 日目 Tgbov 脳組織における mAb132 の反応性. 緑: mAb132. 青: 核. (B) C-, H-, L-BSE 感染末期および非感染 Tgbov, ICR 非感染脳組織 (橋) における mAb8D5 の反応性. 赤: mAb8D5. 青: 核.

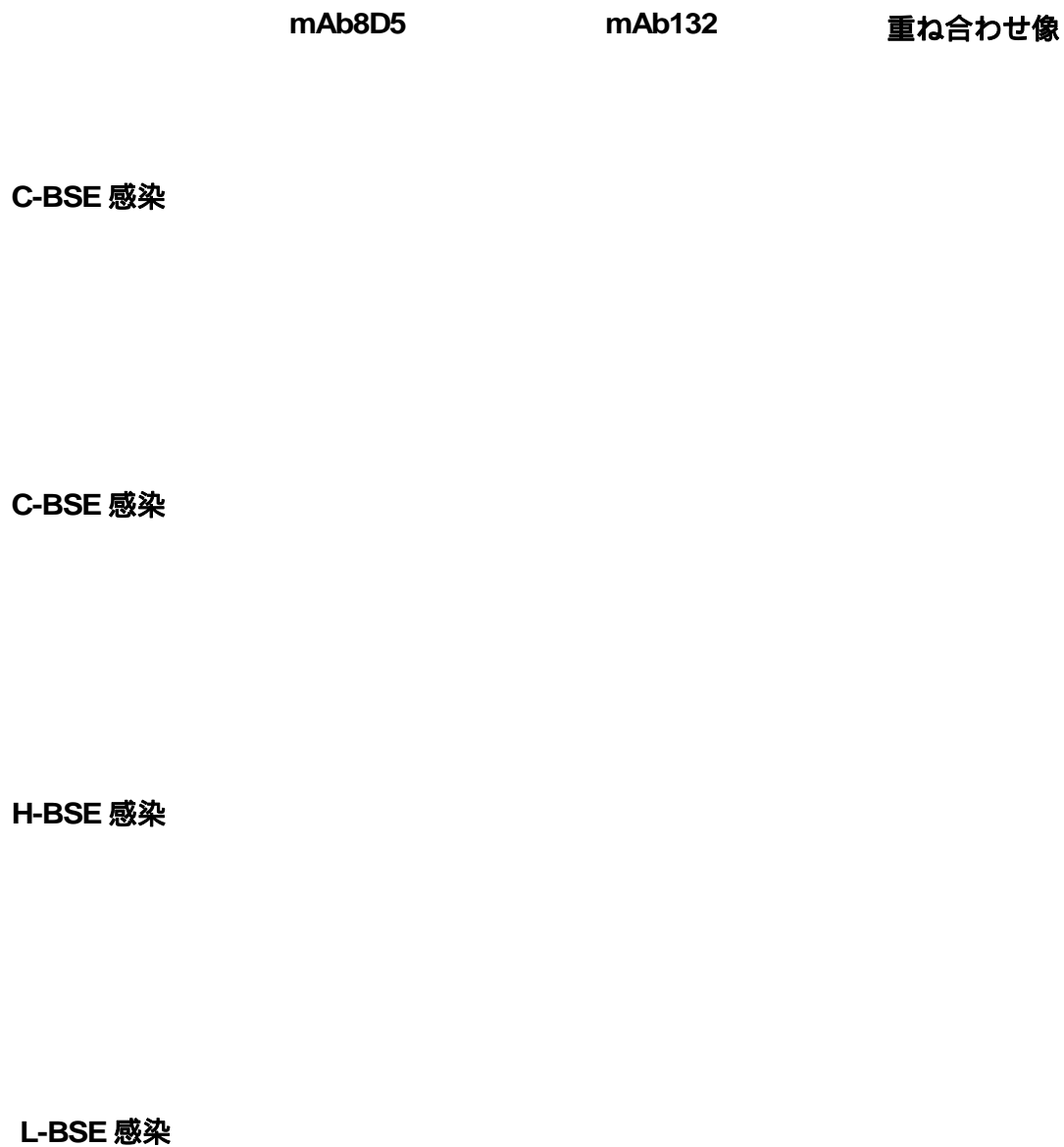


図 3. C-, H-, L-BSE 感染末期 Tgbov 脳組織 (橋) における mAb132 と 8D5 による二重染色. 緑: mAb132
赤: mAb8D5. 青: 核.

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 家畜衛生グループ 主査

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、非定型 BSE (L 型) と定型 BSE の脳内接種感染牛の PrP^{Sc} の蓄積動態を比較検討した。延髄および中脳では、非定型 BSE (L 型) は接種後 5 か月で PrP^{Sc} が検出され、定型よりも 5 か月早く PrP^{Sc} が検出された。嗅脚では、L 型は接種後 7 か月で PrP^{Sc} が検出され、定型 (接種後 19 か月) よりも 12 か月早く PrP^{Sc} が検出された。L 型と定型 BSE で脳内の PrP^{Sc} 蓄積動態に違いがあった。非定型 BSE 感染脳の PrP^{Sc} を酸またはアルカリ処理しても定型 BSE の PrP^{Sc} は増幅されず、定型 BSE となる可能性は低いと考えられた。

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、これまでに作出した脳内接種による非定型 L 型 BSE 感染牛の脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量の変化を、これまでに解析したウエスタンブロット (WB) データを用いて定型 BSE と比較検討した。また非定型 BSE 感染脳中の PrP^{Sc} が、酸またはアルカリ処理によって定型 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

非定型 BSE (L 型) (n=11、接種後 2~16 か月) と定型 BSE (n=10、接種後 3~25 か月) 脳内接種感染牛の PrP^{Sc} の蓄積動態を比較検討した。各サンプル 5mg/レーンをマウススクレイピー感染脳 6.4μg および 1.6μg と WB のバンド濃度で数値化し比較した。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

10% 非定型 L 型 BSE 感染脳乳剤を、2 規定 (N) から 2 倍階段希釈 (2~1/16N) した等量の塩酸または水酸化ナトリウムと混合した。定型 BSE の PrP^{Sc} を増幅する PMCA 法 (PMCA (定型)) を実施し、WB 法で定型 BSE の PrP^{Sc} 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

延髄および中脳では、非定型 BSE (L 型) は接種後 5 か月で、定型は 10 か月で PrP^{Sc} が検出され、L 型が 5 か月早く PrP^{Sc} が検出された (図 1)。小脳皮質、大脳皮質前頭部では L 型で接種後 11 か月に対し定型で接種後 18 か月、19 か月に検出され、それぞれ L 型が早く蓄積した。嗅脚では、L 型は接種後 7 か月、定型では接種後 19 か月で検出され、線条体では、L 型は 9 か月、定型は 16 か月で検出された。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

塩酸による処理では、PMCA (定型) による増幅後、1N 以下の検体でわずかな PrP^{Sc} 様のバンドを検出し、無処理でも検出された (図 2)。バンドサイズから定型 BSE と異なると判断した。または水酸化ナトリウム処理では、無処理検体のみ PrP^{Sc} 様のバンドが検出された。酸およびアルカリ処理のいずれも定型 BSE の PrP^{Sc} は検出されなかった。

D. 考察

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

解析を行った脳内のそれぞれの部位で、L 型が定型 BSE よりも早く PrP^{Sc} が蓄積し、L 型と定型 BSE で脳内部位での蓄積動態に違いが認められた。脳内接種による BSE 感染牛では、L 型では接種後 11 か月以降、定型では接種後 18 か月以降に歩行異常や音への過剰反応などの神経症状が出現する。PrP^{Sc} の検出時期は、中脳および延髄では、

L 型は発症のおよそ 6 か月前、定型では 8 か月前に PrP^{Sc} の検出が可能であった。

小脳皮質および大脳皮質では、L 型が 7~8 か月程度早く PrP^{Sc} の検出が可能であったものの、L 型および定型とも、発症時期とほぼ同じ時期であり、PrP^{Sc} の脳内での蓄積状況が症状の出現に関連することが示唆された。

線条体では、L 型および定型のいずれでも発症時期より 2 か月程度早く、PrP^{Sc} が検出された。

嗅脚における PrP^{Sc} の検出時期は、L 型は定型に比べ、12 か月早い接種後 7 か月であった。嗅脚は、線条体よりも中脳および延髄からは遠位であるが、L 型の PrP^{Sc} の蓄積時期が定型よりも早いことから、L 型 BSE の PrP^{Sc} が蓄積しやすい部位であることが示唆され、BSE 株の違いによる L 型 BSE の特徴と考えられた。

2) 物理・化学的処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

塩酸または水酸化ナトリウム処理による非定型 L 型 BSE 乳剤への影響では、酸およびアルカリ処理のいずれも定型 BSE の PrP^{Sc} は検出されなかった。塩酸処理では、1N 以下の検体でわずかに PrP^{Sc} 様のバンドを検出したが、無処理でも検出されたことから、塩酸処理では分解されず、残った L 型 PrP^{Sc} であると考えられた。無糖鎖型のバンドサイズから定型 BSE と異なると判断した。

または水酸化ナトリウム処理では、2N から 1/16N の水酸化ナトリウムで PrP^{Sc} をできず、測定限界以下の濃度に分解されたものと思われた。

以上のように、非定型 BSE 感染脳内の PrP^{Sc} が、酸またはアルカリ処理によって、定型 BSE となる可能性は低いと考えられた。

E. 結論

それぞれ L 型が早く蓄積し、L 型と定型 BSE で脳内部位での蓄積動態に違いが認められた。

また非定型 BSE 感染脳内の PrP^{Sc} が、酸またはアルカリ処理によって、定型 BSE となる可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
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

以下に図表を入れて下さい。

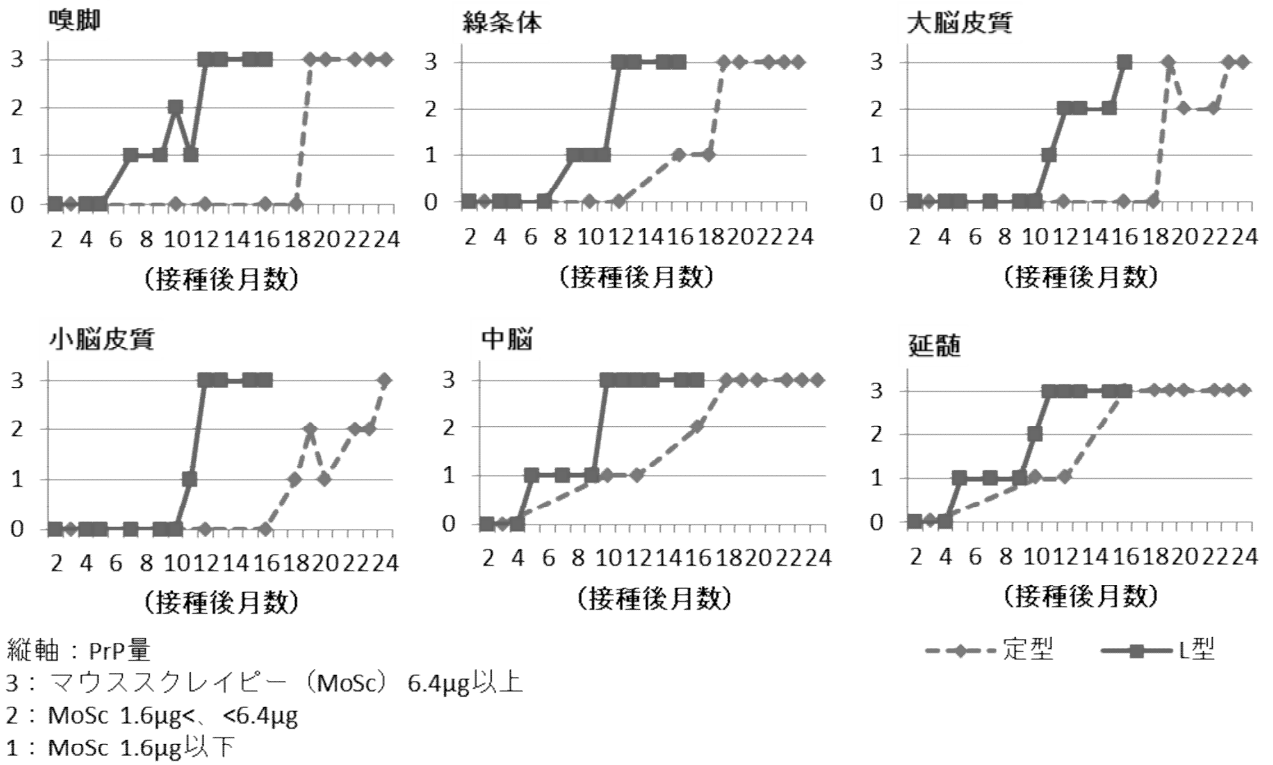


図1 非定型 BSE 感染牛の PrP^{Sc} の脳内出現部位と経時的蓄積量

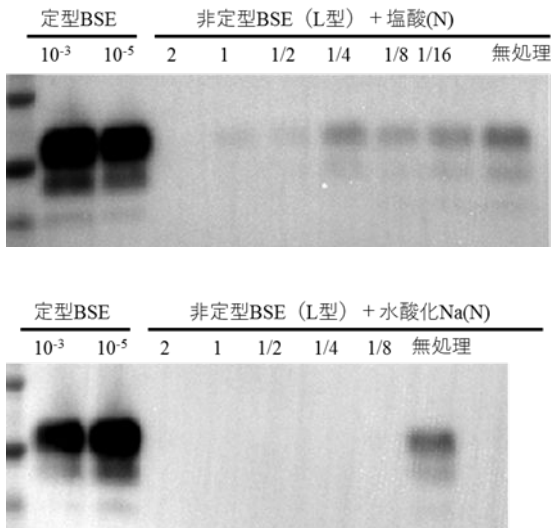


図2 酸またはアルカリ処理による非定型 BSE の PrP^{Sc} への影響

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 畜産学部 准教授

研究要旨 非定型 BSE は生化学的性状、病変分布や PrP^{res} の沈着様式が BSE とは異なるプリオン株で、発生・発症機序を含め、不明な点が多い。本邦で発生した非定型 BSE の一つである L 型 BSE はハムスターへ伝達し、モルモットへの伝達性は認められない。一方、BSE はモルモットへ伝達したが、ハムスターへの伝達性は認められない。本研究は、BSE と非定型 BSE の起源について明らかにすることを目的とし、BSE および L 型 BSE の異種間伝達実験を計画した。プリオンが伝達された動物の病理学的特徴を比較することで、種間伝達によるプリオン株の表現型がどのように変化するのか、あるいは維持されるのかを評価した。BSE モルモット馴化株(BSE/gu)をハムスターに、L 型 BSE ハムスター馴化株(L-BSE/ham)をモルモットに脳内接種した。BSE 伝達モルモットでは、顆粒細胞の減数と分子層の菲薄化による小脳皮質の萎縮が顕著であった。また、脳全体に PrP^{res} の沈着が認められ、プラーク状沈着が特徴的であった。L 型 BSE 伝達ハムスターでは脳全体にび慢性の PrP^{res} の沈着が認められ、微細顆粒状や血管周囲への小斑状の沈着が特徴的であった。BSE/gu 伝達ハムスターでは、脳全体に PrP^{res} の沈着が認められ、海馬、間脳、大脳へのび慢性、放射状沈着が主であった。BSE/gu 伝達ハムスターでは、BSE 伝達モルモットでみられる特徴的な小脳病変は形成されず、L 型 BSE 伝達ハムスターでみられる特徴的な沈着分布や沈着パターンの多くがみられた。今回の結果により、プリオン株の異種間伝達における病理学的特徴は、動物種とプリオン株のいずれにも影響を受けていることが明らかとなった。BSE と L-BSE の関連については、経過観察中の L-BSE/ham および BSE/gu/ham 接種モルモットの病理学的特徴により更なる考察が可能になると考えている。

A . 研究目的

1986 年に最初の BSE がイギリスで発見されてから 30 年以上が経過した現在でも、BSE の起源については、スクレイパーが種の壁を越えてウシへ伝達された可能性、孤発性のウシ TSE、あるいはヒト TSE 疾患に由来する等議論がある。BSE はその生物学的・生化学的な特徴の分析から、1 つのプリオン株が原因であると考えられてきた。しかしながら、2003 年以降、その生化学的性状や病変分布、異常型プリオン蛋白の沈着パターンが定型 BSE とは異なるプリオン株が報告されている。この非定型 BSE は、フランスやイタリアをはじめとするヨーロッパ諸国や北米で発生しており、2004 年には日本でも発生が確認されている。非定型 BSE は、無糖鎖 PrP^{res} の分子量に基づいて、定型 BSE の 20kDa よりも低分子量 (19kDa) を示す L 型 (L 型 BSE) と高分子量 (21kDa) を示す H 型 (H 型 BSE) の 2 種類に大別される。これまでフランスやドイツ、ポーランドなどでは、L 型 BSE と H 型 BSE の両方の発症が確認されているが、日本では L 型 BSE の報告のみに留まっている。非定型 BSE の起源は明らかでなく、孤発性である可能性も指摘されているが、その詳しい性状については更なる検討が必要と思われる。定型 BSE と

非定型 BSE の関連についての研究では、イタリアで発生した L 型 BSE の一つである、アミロイド班を特徴とする Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy (BASE) を用いた報告がある。その研究では、C57BL/6 マウスへの BASE 発症牛由来の PrP^{res} の継代感染を通し、PrP^{res} の生化学的性状や沈着パターンについての表現型が BASE 感染マウスと定型 BSE 感染マウスで区別し難くなったことを報告している。この同系マウスへの継代感染実験は、BASE 株が定型 BSE 株に変換する可能性を示唆している。また、H 型 BSE 野外発生牛由来の PrP^{res} を C57BL/6 マウスに脳内接種する継代感染実験においても、2 代目のマウスにおいて定型 BSE の PrP^{res} の性状の出現が認められており、これら結果から、定型 BSE は非定型 BSE に由来する可能性が示唆されている。

プリオンの種間伝達には、PrP^{res} のアミノ酸配列や宿主の PrP^C のアミノ酸配列の相同性に起因する「種の壁」が存在し、伝達可能な動物種の制限や潜伏期間の著しい増大、伝達確率の低下などが生じる。これまでの報告では、L 型 BSE は実験的に、ウシ、ヒツジ、ウシ、ヒツジ、あるいはヒト PrP 遺伝子導入 Tg マウス、ハムスターおよび霊長類が脳内接種で伝達されている。また、成功例は 1

例であるが野生型マウスへの伝達についても報告されている。これまでの研究で、本邦で発生した L 型 BSE はハムスターへ伝達性を示すが、モルモットへの伝達は認められなかった。一方、定型 BSE はモルモットへ伝達性を示したが、ハムスターへの伝達は認められなかった。

本研究は、定型 BSE と L 型 BSE の起源に関する考察を目的として、定型 BSE および L 型 BSE を用いて、プリオン株の異種間伝達実験を計画した。げっ歯類を用いた本実験では、それぞれ伝達性を示した動物種から伝達性を示さなかった動物種へ PrP^{res} の交差感染を行い、そこで伝達性が成立した場合には、動物種を元に戻して次の代へさらに感染を行う。その中で見られたプリオン伝達動物の病理像を、主にプリオン株と動物種の組み合わせにより特徴的な所見について比較することで、種間伝達によりプリオン株の表現型の変化や一貫性を評価した。動物感染実験に時間を要していることから、最終的な結論には至っていない。しかしながら、今回、BSE モルモット馴化株にハムスターへの伝達性が認められたので、これらプリオン伝達動物の病理像について検索し、BSE と非定型 BSE の関連について考察したので報告する。

B . 研究方法

1) 供試動物および接種材料

シリアンハムスター (Slc:Syrian) 、モルモット (Slc:Hartley) をそれぞれ 6 匹 (いずれも、日本 SLC、雌、4~5 週齢) を使用した。また、陰性対照としてシリアンハムスターおよびモルモットを 1 匹ずつ使用した。

接種材料は、BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株 (BSE/gu) を用いて作製した 10% 脳乳剤入り PBS、および感染研より分与された L 型 BSE 感染ウシの脳材料 (BSE/JP24) 由来の L 型 BSE ハムスター馴化株 (L-BSE/ham) を用いて作製した 2.5% 脳乳剤入り PBS を使用した。

2) 接種方法

ハムスターでは 20 μ l、モルモットでは 50 μ l を接種量とし、イソフルラン吸入麻酔下の動物へ上記材料の脳内接種を行った。BSE モルモット馴化株 (BSE/gu) 脳乳剤をハムスターへ接種した。L 型 BSE ハムスター馴化株 (L-BSE/ham) はモルモットへ接種した。

3) 病理学的検索

接種動物は、沈鬱状態や歩様のふらつき、起立困難などの臨床症状がみられる病末期に、エーテル麻酔下で安楽殺し、解剖および採材を行った。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、3 μ m パラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また、今回接種材料に用いたそれぞれ継代の 3 代目に当たる BSE 伝達モルモットおよび L 型 BSE 伝達ハムスターの脳を比較として用いた。

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、二次抗体には HRP 標識ウサギ抗体 (Dako Envision Kit、DAKO、U.S.A.) を用いた。また、PrP^{res} 沈着と神経細胞の関連を評価するために、アストログリアを標識する抗 GFAP ポリクローナル抗体、ミクログリアを標識する抗 Iba-1 ポリクローナル抗体を用いた。二次抗体には HRP 標識ウサギ抗体 (Dako Envision Kit、DAKO、U.S.A.) を使用した。PrP^{res} の免疫活性の賦活化には 135DWhA 法を用いた。その他の抗体による免疫染色の前処理には、オートクレーブ法 (121 $^{\circ}$ C、10 分) を実施した。使用抗体の希釈倍率等の詳細は表に示した。

(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

BSE/gu 接種ハムスターでは 2 匹中 2 匹で被毛粗剛や沈鬱、歩様異常などの症状がみられた。L-BSE/ham 接種モルモットでは試験的解剖を行った個体および、それ以外の 2 匹は接種後 523 日時点で、いずれの症状も認められておらず、現在経過観察中である。また、BSE モルモット馴化株伝達ハムスター株 (BSE/gu/ham) をモルモットへ接種した BSE/gu/ham 接種モルモット 3 匹は、接種後 148 日時点で臨床症状は見られず、現在経過観察中である (表 1)。剖検時、肉眼的に脳外観および矢状断面に著変は認められなかった。また、他の臓器でも著変は認められなかった。

2) 組織学的検索および免疫組織学的検索

BSE 伝達モルモットでは、大脳および小脳皮質、脳幹部において空胞変性が確認された。特に、大脳と間脳に強い変性が認められた (図 1a, 1d)。小脳においては、顆粒層の減数と分子層の菲薄化が認められ、それによる小脳皮質の萎縮が顕著であった (図 2a, 2d)。抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色では大脳皮質軟膜下への沈着は認められなかった (図 3a)。沈着様式ではプラーク状や微細顆粒状、放射状、び慢性の PrP^{res} の沈着が確認された (図 4a,

4d, 4g)。

BSE/gu 伝達ハムスターでは、大脳および小脳皮質、脳幹部において神経網や神経細胞細胞質内に空胞変性が確認された(図 1b, 1e)。しかしながら、BSE 伝達モルモットに見られる特徴的な小脳病変は見られなかった(図 2b, 2e)抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色では大脳皮質の軟膜下や海馬において、び慢性に顕著な PrP^{res} の沈着が認められた(図 3b)。微細顆粒状、血管周囲への小型斑状、放射状やび慢性の PrP^{res} の沈着が確認された(図 4b, 4e, 4h)。

L 型 BSE 伝達ハムスターでは、大脳および脳幹部において神経網や神経細胞細胞質内に空胞変性が確認された(図 1c)。小脳には特徴的な病変は見られなかった(図 2c, 2f)。抗 PrP 抗体では大脳皮質軟膜下において PrP^{res} の沈着が認められた(図 3c)。小脳皮質を除く脳全体にて、抗 PrP^{res} 抗体によって微細顆粒状、血管や神経細胞周囲への小型斑状やび慢性の PrP^{res} の沈着が確認された。海馬へのび慢性の顕著な沈着も確認された(図 4c, 4f, 4i)。

L-BSE/ham 接種モルモットでは、脳内接種後 480 日の時点で、脳および脾臓への PrP^{res} の沈着は確認されていない。

D . 考察

BSE モルモット馴化株はハムスターへ伝達することが確認できた。種間伝達によるプリオン株の宿主範囲の変更は BSE や CWD などいくつかのプリオン株で報告されている。C57Bl/6 マウスで継代された BSE プリオンを、本来は BSE への感受性をもたないハムスターへ接種した実験では、BSE プリオンがハムスターへ 100% の伝達性を示した。また、マウスとハムスターの種の壁の原因となるアミノ酸配列がハムスターと相同な MH2M マウスを用いた実験では、MH2M マウスは一次接種では BSE プリオンに伝達性を示さなかったが、ICR マウスで継代された BSE プリオンは二次接種で同系統のマウスに伝達した。今回の結果は、これら報告と一致し、BSE プリオンの異種での継代により、プリオン株の生物学的性状が変化し、伝達性を獲得したことを示した。このように、プリオン株への感受性を示す宿主域は、種間伝達を介して比較的容易に変化すると考えられている。

病末期までの平均日数は、BSE 伝達モルモットと比較して、それを接種したハムスターで延長した。フェレット由来の CWD プリオンをシリアンハムスターへ接種した実験では、一次伝達にハムスター由来株を用いた場合の数倍に当たる 17 から 21 カ月を要したと報告されている。また、その後の

同系ハムスターを用いた継代の 3 代目では、その日数がおよそ 5 カ月短縮されている。このように、今回の病末期までの平均日数の延長はハムスターとモルモットとの種の壁が影響したためと考えられた。

プリオン株の病理学的特徴の比較では、BSE/gu 伝達ハムスターにおいて、BSE 伝達モルモットで見られる特徴的な小脳病変は形成されなかった。また、BSE 伝達モルモットでみられる PrP^{res} のプラーク状沈着も認められなかった。一方で、L 型 BSE 伝達ハムスターで見られる大脳皮質軟膜下への沈着や海馬への顕著なび慢性の PrP^{res} 沈着が BSE/gu 伝達ハムスターで確認された。また、沈着パターンにおいては血管周囲への小型斑状の沈着が認められた。しかしながら、BSE/gu 伝達ハムスターには、沈着パターンは異なるものの小脳皮質への PrP^{res} 沈着や放射状の沈着パターンを有するなど BSE 伝達モルモットとは共通するが、L 型 BSE 伝達ハムスターとは異なる特徴も確認された。これらのことから、病理学的特徴は、異種間伝達で維持されるものと維持されないものが存在するという結果になった。BSE/gu 伝達ハムスターと L-BSE 伝達ハムスターでは PrP^{res} の沈着パターンは、微細顆粒状沈着が認められ、プラーク状沈着が見られない点で一致していた。また、BSE/gu 伝達ハムスターでは、L 型 BSE 伝達ハムスターに見られない放射状沈着が認められた。このように、同じ動物種ハムスターで比較すると、PrP^{res} の沈着パターンについて類似した特徴が認められたが、全ては一致しなかった。種間伝達におけるプリオン株の生物学的・生化学的性状の変化あるいは維持の程度を決めるメカニズムについて詳細は不明であるが、今回の結果から、それが動物種およびプリオン株のどちらにも影響を受けていることが示唆された。BSE プリオンのハムスターへの伝達においてその病理学的特徴の多くが維持されなかったことは、種間伝達における表現型の維持がプリオン株より動物種に影響を受けた結果であると考えられる。今後、経過観察中の個体の病理像、および今回伝達を確認された個体の生化学的な性状の検討を加えることにより、これらの可能性や異種間伝達で得られたプリオン株の表現型の維持に関する評価をより明らかにすることができると考える。

本研究により、BSE モルモット馴化株はハムスターへ伝達することが確認できた。馴化株が伝達されたハムスターの病理学的特徴の比較により、BSE の種間伝達には動物種とプリオン株の双方が関連し、その病理学的特徴はどちらにも影響を受けていることが示唆された。

本実験では、BSE と L-BSE が羊などの異種動物に

伝達され、さらに牛に伝達された際に、その牛が BSE の特徴を示す、あるいは L-BSE の特徴を示す可能性を検証している。これらの検証は、L-BSE/ham 接種モルモットおよび BSE/gu/ham 接種モルモットに伝達性が認められた場合に、その病理学的特徴から、更なる考察が可能になると考える。また、さらに BSE/mo 伝達ハムスターや L 型 BSE/ham 伝達モルモットを同種にて継代を行い、それら表現型の安定性を確認する必要もあると考える。

E．結論

BSE モルモット馴化株、LBSE ハムスター馴化株による異種間伝達試験を実施した。途中経過であるが、プリオン株の異種間伝達における病理学的特徴は、動物種とプリオン株のいずれにも影響を受けていることが明らかとなった。BSE と L-BSE の関連については、経過観察中の L-BSE/ham および BSE/gu/ham 接種モルモットの病理学的特徴により更なる考察が可能になると思われる。

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) 崔 宝隠, 室井喜景, 堀内基広, 古岡秀文, 接種経路の異なる BSE およびスクレイピー株感染スナネズミの病変分布の検索．159 回日本獣医学会学術集会 (2016 年 9 月 6-8 日, 藤沢, 神奈川県)
- 2) 山内 桂, 室井喜景, 堀内基広, 古岡秀文, スクレイピー接種ハムスターの網膜における PrP^{res} 沈着の経時的比較．第 159 回日本獣医学会学術集会 (2016 年 9 月 6-8 日, 藤沢, 神奈川県)

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 伝達性と病末期までの平均日数

接種株	接種動物	伝達性	平均日数	株名
BSE	モルモット		297	BSE/gu
BSE モルモット馴化株	ハムスター		561	BSE/gu/ham
BSE/gu/ham	モルモット	?	経過観察中	
LBSE	ハムスター		130	LBSE/ham
LBSE ハムスター馴化株	モルモット	?	経過観察中	

図 1 大脳および間脳

BSE/gu BSE/gu/ham LBSE/ham

図 2 小脳

BSE/gu BSE/gu/ham LBSE/ham

図 3 大脳皮質 PrP^{res}

BSE/gu BSE/gu/ham LBSE/ham

図 4 PrP^{res} 沈着様式

BSE/gu BSE/gu/ham LBSE/ham

BSE 伝達モルモット (a, d)、BSE/gu 伝達ハムスター (b, e)、L 型 BSE 伝達ハムスター (c, f) では、それぞれ空胞変性が認められた。上段は大脳、下段には間脳を示した。HE 染色

BSE 伝達モルモットでは、小脳顆粒層の脱落および分子層の菲薄化が認められた (a, d)。BSE/gu 伝達ハムスター (b, e) および L 型 BSE 伝達ハムスター (c, f) では、小脳病変は認められなかった。小脳。HE 染色

BSE 伝達モルモットでは大脳皮質軟膜下への沈着は見られなかった (a)。BSE/gu 伝達ハムスター (b) では、L 型 BSE 伝達ハムスター (c) と同様に大脳皮質軟膜下への沈着が認められた。

BSE 伝達モルモットでは、放射状沈着 (a) やブランク状沈着 (d) が認められた。BSE/gu 伝達ハムスターでは、放射状沈着 (b)、微細顆粒状や血管周囲への小斑状の沈着が認められた (e)。L 型 BSE 伝達ハムスターでは、微細顆粒状の沈着と血管周囲への小斑状沈着が認められた (c, f)。海馬では、BSE/gu 伝達ハムスターと L 型 BSE 伝達ハムスターにおいて、顕著な PrP^{res} の沈着がび慢性に認められた (g, h, i)。

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 (国研) 農研機構動物衛生研究部門 上級研究員

研究協力者 松浦 裕一、岡田 洋之、宮澤 光太郎 (国研) 農研機構動物衛生研究部門)

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 の人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 実験感染牛の筋組織に分布するプリオンの感染性を明らかにして、食を介した非定型 BSE の人への感染リスクを定量的に評価することを目的とする。H28 年度は、トランスジェニックマウスを用い、H-BSE プリオンの感染価を測定する手法を開発した。また、トランスジェニックマウスへの感染実験を行い、BSE 感染牛の筋組織には脳と比べて 1/10,000 以下の感染価が分布していることを明らかにした。

A. 研究目的

非定型牛海綿状脳症 (BSE) は、従来型の C-BSE と異なる生物学的性状や生化学的性状を示し、L-BSE と H-BSE が存在する。C-BSE プリオンは人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人へ感染するリスクが危惧される。C-BSE、L-BSE や H-BSE の臨床症状期の牛では、感染因子とされる異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が中枢や末梢の神経系組織に蓄積しており、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、人への感染リスクを考える上で重要である。そこで、非定型 BSE 実験感染牛の筋組織に分布するプリオンの感染価を調べ、食を介した感染リスクを評価することを目的とする。

H28 年度は、L-BSE 感染牛の筋組織に分布するプリオン感染価を調べた。また、H-BSE プリオンについて、トランスジェニック (Tg) マウスの潜伏期間とその感染価の関係を明らかとする。

B. 研究方法

1) L-BSE 感染牛の筋組織の Tg マウス感染実験

国内 24 例目 BSE 症例の脳乳剤を脳内投与した後 16 ヶ月目で発病した L-BSE 感染牛 (#0528、#1016、#5566) の筋肉、特に可食部である上腕三頭筋、半腱様筋、大腰筋、最長筋をリン酸緩衝生理食塩水で 10% 乳剤に調整した。ウシ型プリオン

タンパク質遺伝子過剰発現 Tg マウスの脳内に 10% 筋組織乳剤を投与した。神経症状を呈した Tg マウスを安楽死させ、脳での異常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。脳内に PrP^{Sc} の蓄積が認められた Tg マウスの脳内投与から安楽死までの日数を潜伏期間として算出した。

2) 終末限界希釈法による Tg マウス感染実験

カナダで摘発された H-BSE を脳内投与後に発病した牛の脳をリン酸緩衝生理食塩水で 10% 乳剤に調整し、さらに 10 倍階段希釈液を作製した。ウシ型プリオンタンパク質遺伝子過剰発現 Tg マウスの脳内に 10% 脳乳剤もしくはその希釈液を投与した。神経症状を呈した Tg マウスを安楽死させ、脳での PrP^{Sc} の蓄積をウエスタンブロット法で調べた。脳内に PrP^{Sc} の蓄積が認められた Tg マウスの脳内投与から安楽死までの日数を潜伏期間として算出した。

(倫理面への配慮)

本実験における動物実験は「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)」を遵守し、農研機構動物実験委員会にて承認された。プリオンの取り扱いは、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)」を遵守し、農研機構動物衛生研究部門

バイオセーフティ委員会にて承認された。

C . 研究結果

1) L-BSE 実験感染牛の筋肉に分布する BSE 感染性

可食部である筋組織（上腕三頭筋、半腱様筋、大腰筋、最長筋）のウシ型 Tg マウスへの感染実験では、脳内投与後 240 日から 320 日で神経症状を呈するマウスが認められた（図）。感染陽性率は 100% に至らなかったが、可食部筋組織に Tg マウスへの感染性が認められた。本実験で調べた 3 頭の L-BSE 実験感染牛で同様の結果が得られた。

ウシ型 Tg マウスの潜伏期間や感染率を L-BSE ウシ脳の希釈実験の結果に照らし合わせると、可食部筋組織には脳と比べて 1/10,000 に相当する BSE 感染価が分布していることが示された（図）。

2) H-BSE 実験感染牛脳のウシ型 Tg マウス感染実験

H-BSE 牛脳の 10% 乳剤、その 10^{-1} ~ 10^{-4} 倍希釈液で、PrPSc 陽性のウシ型 Tg マウスが認められた。脳内投与後 500 日を経過したが、 10^{-5} と 10^{-6} 倍希釈液では陽性のウシ型 Tg マウスは確認できなかった（表）。Spearman-Käber 法により H-BSE 牛脳には 1 g 中 $10^{6.6}$ LD₅₀ の感染価が含まれると算出され、H-BSE の感染価はウシ型 Tg マウスの潜伏期間と相関すること（相関係数 $R^2 = 0.98$ ）が示された。

D . 考察

L-BSE の臨床症状期の牛の筋組織（可食部位）に BSE の感染性が分布していることが明らかとなった。筋組織に分布する感染価が脳と比べて 1/10,000 倍に相当することから、L-BSE プリオン

の食を介した人への感染リスクが高くないと考えられる。

ウシ型 Tg マウスは、L-BSE だけでなく H-BSE プリオンにも高感受性であることが考えられ、本実験によって H-BSE プリオンの感染価を測定する基準を樹立して、H-BSE プリオンの定量的な感染リスクの評価が可能となった。

E . 結論

平成 28 年度は L-BSE 臨床症状期の牛での筋組織に BSE 感染性が分布することを明らかにし、人への感染リスクが低いことが推察された。また、H-BSE プリオンの感染リスクを定量的に評価する基準を作製できた。

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
なし
- 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

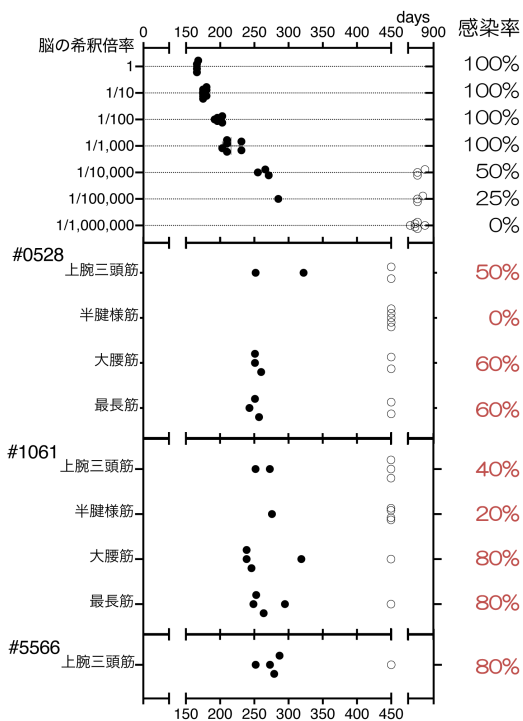


図 L-BSE 感染牛の組織乳剤のウシ型 Tg マウスへの感染性
 ウシ型 Tg マウスの脳内に、10%脳乳剤もしくはその希釈液を投与、もしくは4箇所10%筋組織乳剤を投与した後、PrP^{Sc} 陽性の個体を、陰性を でそれぞれの投与後日数でプロットした。3頭の臨床症状期の L-BSE 感染牛 (#0528、#1061、#5566) からそれぞれの筋組織を投与材料とした。

表 H-BSE 牛脳 of ウシ型 Tg マウスへの感染性

希釈倍率	感染率	PrP ^{Sc} 陽性マウスの潜伏期間 (days ± SD)
1	100% (10/10)	261 ± 6
10 ⁻¹	100% (5/5)	282 ± 6
10 ⁻²	100% (9/9)	301 ± 5
10 ⁻³	80% (4/5)	329 ± 14
10 ⁻⁴	25% (1/4)	444
10 ⁻⁵	0% (0/5)	>500
10 ⁻⁶	0% (0/4)	>500

