

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

平成 28 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

（北海道大学大学院獣医学研究科）

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

平成 28 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

（北海道大学大学院獣医学研究科）

平成 27 年度 食品の安全確保推進研究事業
「非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究」
班員名簿

堀内 基広	北海道大学・大学院獣医学研究科・獣医衛生学教室	教授
新 竜一郎	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染分子解析学分野	准教授
柴田 宏昭	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	プロジェクト研究員
飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
萩原 健一	国立感染症研究所・細胞生化学部	第 1 室室長
長谷部 理絵	北海道大学・大学院獣医学研究科・獣医衛生学教室	講師
福田 茂夫	北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部畜産工学グループ	研究主任
室井 喜景	帯広畜産大学畜産学部・基礎獣医学研究部門	准教授
岩丸 祥史	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構農研機構動物衛生研究所	主任研究員

目次

I.	総括研究報告書（平成 27 年度）	
	非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・	1
	研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
II.	分担研究報告書	
1.	潜在的 L-BSE のモニタリングに使用可能な RT-QuIC 法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・	7
	研究代表者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
2.	非定型 BSE PrP ^{Sc} を検出する RT-QUIC 法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・	13
	研究分担者 新 竜一郎（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科）	
3.	カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価・・・・・・・・・・・・・・・・	17
	研究分担者 柴田 宏昭（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）	
4.	非定型 BSE 感染サルの神経病理学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・	25
	研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）	
5.	霊長類モデルへの伝播による非定型 BSE プリオンの蛋白質化学解析・・・・・・・・・・	29
	研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）	
6.	異なるエピトープを認識する 2 種の抗 PrP 抗体を用いた免疫染色による・・・・・・・・	35
	L 型 BSE 感染牛脳組織の PrP ^{Sc} の検出	
	研究分担者 長谷部 理絵（北海道大学・大学院獣医学研究科）	
7.	非定型 BSE 感染牛における異常型プリオンタンパク質蓄積の経時的解析・・・・・・・・	41
	研究分担者 福田 茂夫（北海道総合研究機構畜産試験場・基盤研究部）	
8.	非定型 BSE および CWD プリオンの生物学的性状解析・・・・・・・・・・・・・・・・	45
	研究分担者 室井 喜景（帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門）	
9.	非定型 BSE 感染牛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・・・	53
	研究分担者 岩丸 祥史（農研機構・動物衛生研究所）	
III.	研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・	57
IV.	研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・	59

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価の有無を調べている途中である。

2) 非定型 BSE のヒトへのリスクの推定に資する研究

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

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

3) 潜在的な非定型 BSE の存在リスクの推定、非定型 BSE が定型 BSE の起源となる可能性の推定

rCerPrP を基質として RT-QuIC を実施した場合、高濃度の脳乳剤存在下でも、Tg マウスを用いるバイオアッセイよりも高感度に L-BSE を検出できた。潜在的な L-BSE が存在する可能性を調査するために必要な性能を有する RT-QuIC 法は確立できたが、C-BSE の検出感度は高くないため、基質をハタネズミ (Bank vole) 由来あるいは他の rPrP に置き換えて、実用レベルの C-BSE 調査用 RT-QuIC を構築する必要がある。また、H-BSE を高感度に検出する RT-QuIC 法の条件検討も今後の課題である。

E. 結論

1) 非定型 BSE 感染動物における感染病態機序の解明

- ・ 非定型 L 型 BSE 感染牛の臨床症状が確認される約 6 ヶ月前頃から PrP^{Sc}が検出されることが明らかとなった。
- ・ ハムスターを用いた L-BSE の病態解析から、L-BSE は末梢組織への親和性が乏しいこと、中枢神経系組織内で、血行性あるいは血管周囲器官が L-BSE の組織内伝播に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

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

研究分担者 堀内 基広 北海道大学大学院・獣医学研究科

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学大学院・獣医学研究科)

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1) 組換えタンパク質の精製

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

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

2) RT-QuIC 法

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

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

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている (実験番号 2014-1-61)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会で承認された動物実験計画書(実験番号 13058, 13059)に従って実施した。

C. 研究結果

1) 高濃度の脳乳剤による RT-QuIC 反応の阻害

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

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

2) 各種 PrP^{Sc} 濃縮法の応用

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

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

3) rCerPrP を基質とした L-BSE プリオンの検出

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

D. 考察

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

この問題を解決するために、NaPTA 沈殿、アルコール沈殿、および PrP^{Sc} 特異抗体による免疫沈降を試みたが、実用レベルに達する改善には至らなかった。しかし、rCerPrP を基質として用いることで、L-BSE プリオンを高濃度脳乳剤から高感度に検出することが可能となった。TgBovPrP を用いたバイオアッセイでは脳乳剤の希釈として 10⁻⁶ まで、感染価が認められている。この脳乳剤は RT-QuIC の希釈の 5 × 10⁻⁸ に相当する。RT-QuIC 法では 5 × 10⁻¹⁰ まで L-BSE プリオンが検出されたことから、rCerPrP を基質とした L-BSE プリオン検出用の RT-QuIC 法はバイオアッセイよりも 10 ~ 100 倍感度が高いと考えられる。

また、反応系の脳乳剤最高濃度である 5 × 10⁻³ でも L-BSE プリオンを検出できたことから、本法は、脳組織中に微量に存在する L-BSE を迅速、簡便、かつ高感度に検出することを目的とした調査に応用可能である。

E. 結論

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

[参考文献]

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

175-178, 2010.

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得
該当なし
- 2 . 実用新案登録
該当なし

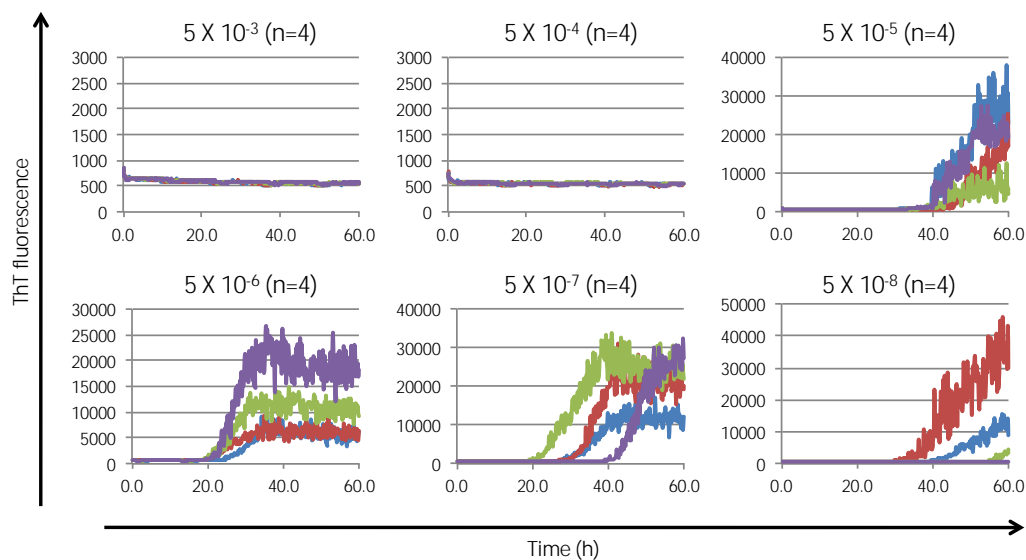


図 1. 高濃度の脳乳剤による RT-QuIC 反応の阻害

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

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

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

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

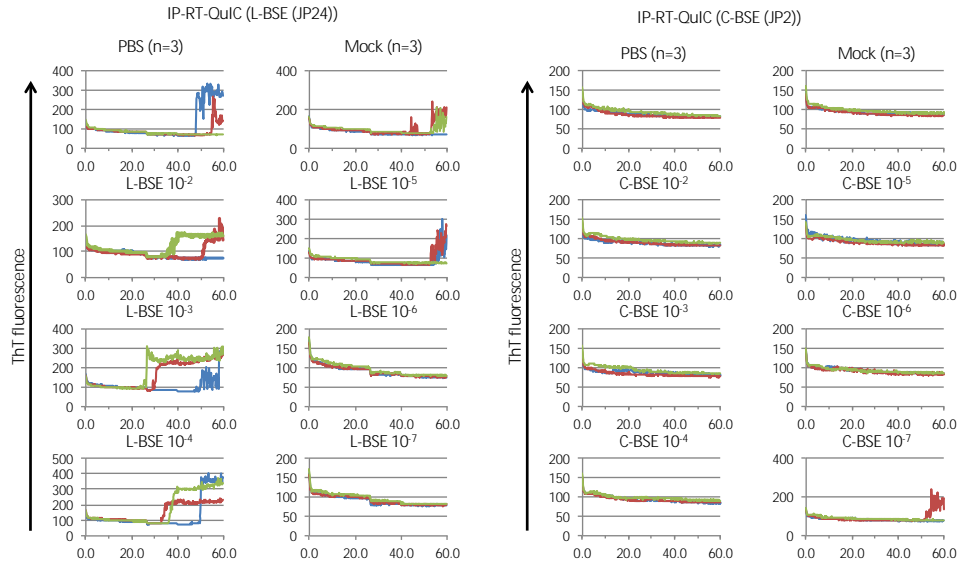


図 3. 免疫沈降法 (IP) -RT-QuIC 法による BSE プリオンの検出

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

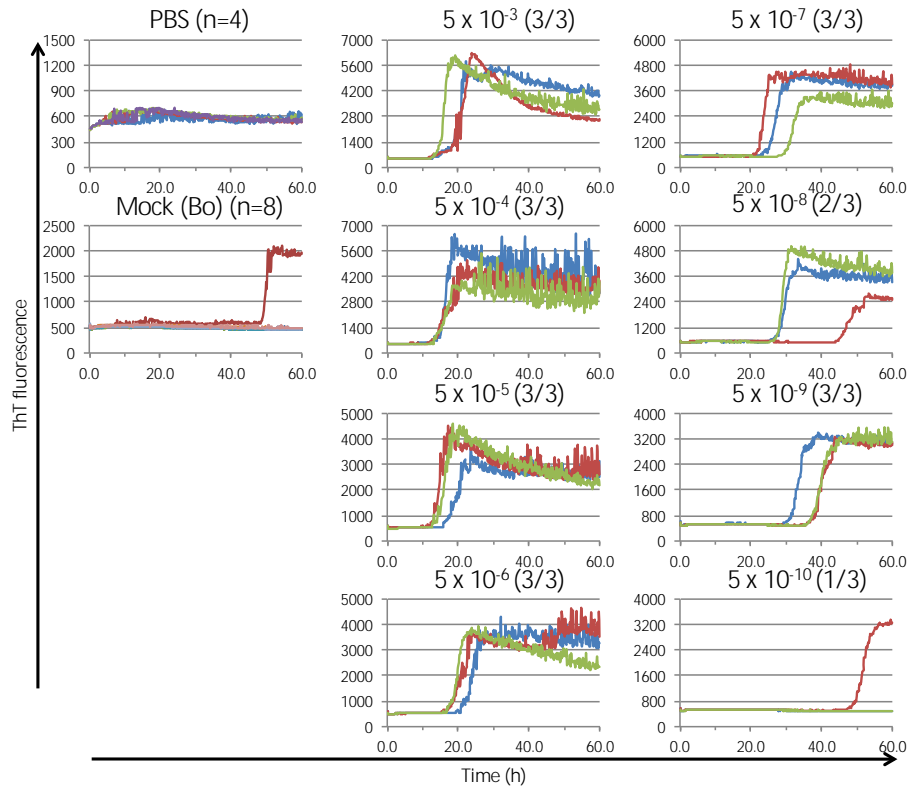


図 4. rCerPrP を用いた RT-QuIC 法による L-BSE プリオンの検出

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

2. 非定型 BSE PrP^{Sc} を検出する RT-QUIC 法の開発

分担研究者 新 竜一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究協力者 小野香織 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

西田教行 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

福田茂夫 (北海道立総合研究機構 畜産試験場)

研究要旨

本研究では異常型プリオンタンパク (PrP) 試験管内増幅法 (RT-QUIC 法: real-time quaking-induced conversion) により非典型 BSE (L-BSE) 感染動物由来の組織・体液に存在する異常型 PrP を微量でも増幅し検出できる高感度検査法を確立するとともにこの手法を応用し、定型 BSE (C-BSE) との鑑別することを目的としている。これまでの研究により Mouse rPrP (rMoPrP) を基質とした RT-QUIC 法は非定型 BSE (L-BSE)、定型 BSE (C-BSE)、ともに効率よく増幅可能であるが、一方、Hamster rPrP (rHaPrP) は L-BSE には rMoPrP と遜色ないレベルで反応するのに対して C-BSE に対してほとんど反応せず、さらにこの性質は rMoPrP-RT-QUIC 法で Round2 でも維持されていた。この性質を用いることにより RT-QUIC 法により C-BSE と L-BSE が原理的に鑑別可能である。興味深いことに Round 4 以降は rMoPrP、rHaPrP の両者に反応するフィブリルが生成された。これらの結果は RT-QUIC 法では非特異的なフィブリルがより形成されやすく、一旦形成されると増幅傾向が高いことを示している。このように *in vivo* と異なるものの、RT-QUIC 法においても PrP 配列やプリオン株が変換反応に大きく関係する可能性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

非定型 BSE (L-BSE) は定型 BSE (C-BSE) と異なり、孤発性に発生する可能性が考えられるなど、その発症機序やヒトへの感染性のリスクに対する評価が十分に検証されていない。本研究では、我々が開発した異常型プリオンタンパク (PrP) 試験管内増幅法 (RT-QUIC 法: real-time quaking-induced conversion) を用いて、非定型 BSE の高感度検査法を確立し、それを応用した非定型 BSE に対する安全対策の向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP (recPrP) の精製

マウス、ハムスターの full PrP 配列 (23-231) の発現ベクターを作製し、大腸菌 (pET vector) に形質転換し、発現誘導した。PrP は、金属イオンに結合性を有するため、ヒスチジンタグを導入しなくても金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製可能である。大腸菌に recPrP

を発現させると封入体を形成するため、6M のグアニジン塩酸で溶解した後、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) を用いて数時間かけてグアニジン塩酸濃度を 6M から 0M まで徐々に勾配させて rPrP を refold させた後、イミダゾールにより溶出した。透析後、recPrP 溶液は小分けして急速凍結し -80 で保存した。

2) RT-QUIC 法

RT-QUIC 法はテカン社製蛍光プレートリーダー (TECAN Infinite F200) を用いて、30 秒間隔で Shaking と incubation (37°C) を繰り返し 10 分に 1 回蛍光測定を行うプロトコールで行った。Buffer 条件は 500mM NaCl, 25mM PIPES pH7.0, 1mM EDTA, 10 μ M ThT (Thioflavin T) であった。recPrP の濃度は 60-120 μ g/ml の範囲で最適条件を検討した。RT-QUIC 反応のシードとしては L-BSE あるいは C-BSE 感染牛脳乳剤を用い、陰性コントロールとしてシードなし、あるいは非感染牛脳乳剤を添加したものをを用いた。また RT-QUIC 法と end-point dilution の組合せによる L-BSE、C-BSE 脳乳剤中

のシード活性の半定量を行った。

3) RT-QUIC 法を応用したプリオン株鑑別検査法の開発

マウス配列 recPrP (recMoPrP) とハムスター配列 recPrP (recHaPrP) に対する L-BSE と C-BSE の RT-QUIC 法における反応の顕著な違いを利用して両者の鑑別法の開発を試みた。さらにそれらの性質が以降も維持されるかどうか Round5 まで RT-QUIC 反応を行った。

(倫理面への配慮)

L-BSE, C-BSE 感染牛脳乳剤は、国立感染症研究所感染病理部あるいは北海道立畜産試験場基盤研究部より共同研究として提供された。それらは牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し、許可を得たものである。

C. 研究結果

1) L-BSE と C-BSE の RT-QUIC 法における recMoPrP、recHaPrP へのシード活性の顕著な違い

recMoPrP、recHaPrP を反応基質として用い、L-BSE、C-BSE をそれぞれシードとして RT-QUIC 法を行なった(図 1)。その結果、L-BSE は recMoPrP、recHaPrP の両者に対してシード活性を示したのに対して C-BSE は rHaPrP に全く活性を示さなかった。さらに L-BSE、C-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代を継続(最初の反応を Round1 とし、その反応液の希釈液の一部を次の反応(Round2)のシードとして RT-QUIC 法を実施)したところ、Round2 においても recHaPrP は C-BSE 由来の recMoPrP フィブリルに対して反応を示さなかった(図 1)。それに対して L-BSE 由来の recMoPrP フィブリルや recHaPrP フィブリルでは rMoPrP、rHaPrP の両者に高い反応を示した(図 1)。

2) C-BSE、L-BSE をシードとした RT-QUIC 法の継代反応

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

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

D. 考察

研究結果で示したような Round 2 まで含めた recMoPrP と recHaPrP の反応性の違いを利用すれば L-BSE と C-BSE の鑑別が RT-QUIC 法によって可能である。すなわち、仮に L-BSE が Round1 においてたまたま recHaPrP にシード活性を示さず、recMoPrP にも陽性だったとしても Round 2 を行うことにより、L-BSE を C-BSE と間違っ て判定することを除外できる。

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

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

E. 結論

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

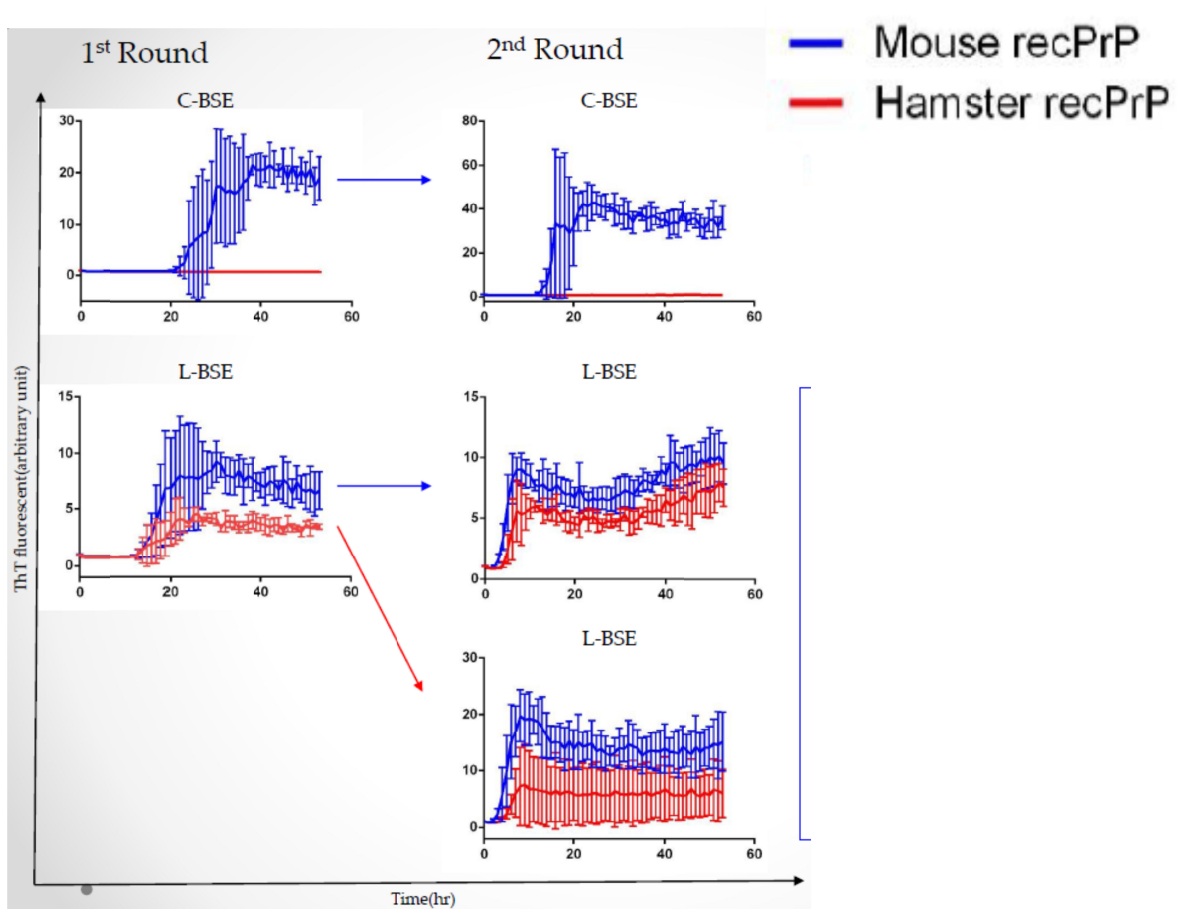
F. 健康危険情報

G. 研究発表

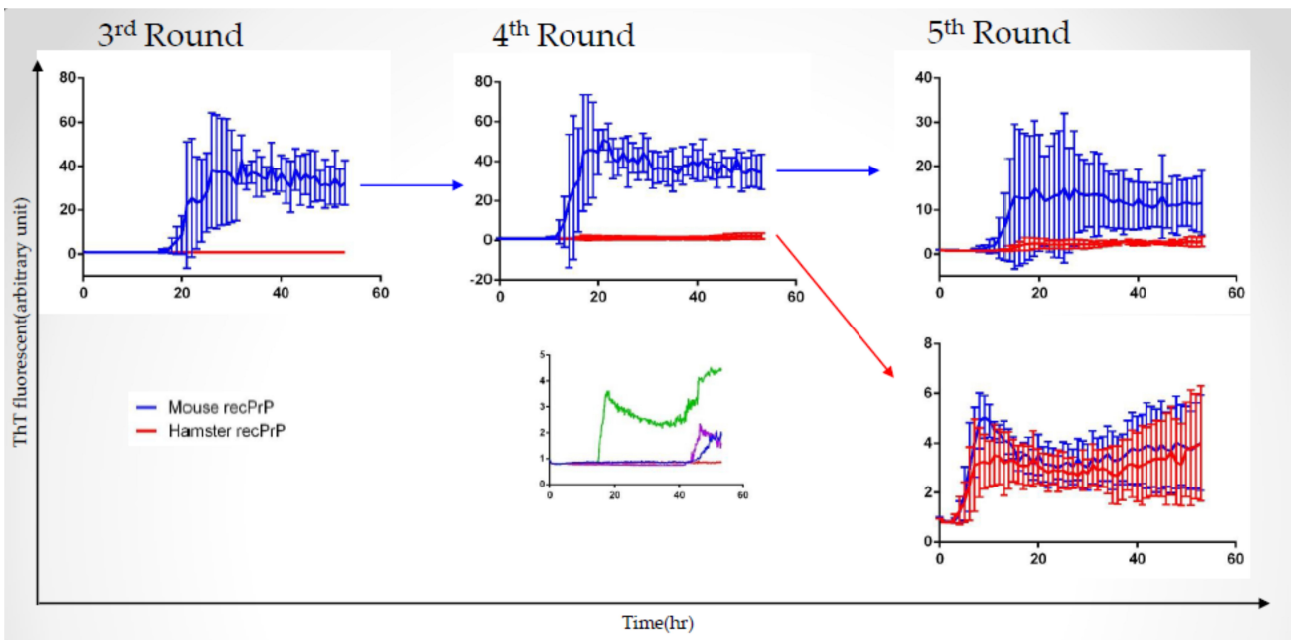
1. 論文発表

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

☒ 1



☒ 2



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 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

研究協力者 小野文子 千葉科学大学

村山裕一 農研機構動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
岡林佐知 一般社団法人予防衛生協会

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。定型 BSE (C-BSE) 及び非定型 BSE (L-BSE) 感染ウシ脳乳剤のサル脳内接種により発症が認められたことは既に報告しているが、ヒトへの感染リスクを評価する上で必要となる経口投与群においては、C-BSE では 12 年、L-BSE では 4 年以上接種後経過したが、臨床症状は未だ認められていない。しかしながら、C-BSE 感染サル由来 PrP^{Sc} に引き続き、昨年度、L-BSE 感染由来 PrP^{Sc} の超高感度検出系を確立したが、その系を用いたところ、L-BSE 経口投与群の 1 頭の唾液から微量の PrP^{Sc} が検出された。公衆衛生上重要なヒトへの経口による L-BSE 伝播リスクが示唆された。また、今年度は、H 型非定型 BSE (H-BSE) 感染ウシ脳乳剤のサル脳内接種及び経口投与を行った。現在、H-BSE 接種群は発症していないが、経過観察を行い、L-BSE、H-BSE それぞれのヒトへの感受性の推定、病態解明を行うと共に感染性や臨床症状等を C-BSE と比較していく。

A. 研究目的

非定型 BSE プリオン (BSE-P) のヒトへの感染リスク評価指標の確立及び定型 BSE (C-BSE)、非定型 BSE (L-BSE 及び H-BSE) 感染による病態比較を目的に、ヒトに近い霊長類であるカニクイザル 26 頭を用いて、C-BSE、L-BSE、H-BSE 感染ウシ脳乳剤の接種実験を行った。発症までの定期的臨床症状、運動機能、高次脳機能及び脳液を観察、測定し、安楽殺後の MRI 所見についての臨床病態解析を行うと共に蛋白及び組織病理学的解析を行う。また感染性や臨床症状等を定型、非定型 BSE 間で比較する。更に BSE-P 接種後定期的に採取したサルの血液、脳脊髄液、尿、唾液及び主要組織を研究班の研究資源として提供することを目的とした。

B. 研究方法

1) 供試動物と接種方法

1.4~2.4 歳の育成雄カニクイザル 26 頭を用いた。

使用動物は、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。

第 1 群: C-BSE 初代接種初期検索群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10% 脳乳剤を接種した。

経口投与 (脳乳剤 2.0 ml) 2 頭(#1, 2)

腹腔内接種 (脳乳剤 2.0 ml) 2 頭(#3, 4)

接種後 3 か月、6 か月目に各群 1 頭安楽死を行い異常プリオン蛋白の初期対内分布について検索を行った。

第2群：C-BSE 初代接種群

カニクイザル 6 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 感染ウシの 10%脳乳剤を、それぞれの経路で接種した。

経口投与 (脳乳剤 2.0 ml x 3 回) 3 頭 (#5, 6, 9)

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 3 頭 (#7, 10, 11)

脳内接種群 3 頭は発症後、経口投与群 3 頭中 1 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。2 頭は経過観察中。

第3群：C-BSE 第2継代接種群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、第2群で発症したカニクイザル (#7) の材料を用いて、それぞれの経路で接種した。

静脈内接種 (血液 40.0 ml) 2 頭 (#12, 13)

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭 (#16, 17)

脳内接種群 2 頭は発症後、輸血群 2 頭中 1 頭は未発症にて安楽死を行い検索に供した。1 頭は経過観察中。

第4群：C-BSE 第3継代接種群

カニクイザル 2 頭に第3群で発症したカニクイザル (#17) 10%脳乳剤を、脳内接種を行った。

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭 (#20, 21) 脳内接種群 2 頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

第5群：L-BSE 初代接種群

カニクイザル 4 頭を下記の 2 群に分け、BSE (BSE JP/8 和歌山) 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 (#14, 15)

経口投与 (脳乳剤 5.0 ml x 8 回) 2 頭 (#18, 19)

脳内接種群 2 頭は発症後安楽死を行い検索に供した。経口投与群は経過観察中。

第6群：L-BSE 第2継代接種群

カニクイザル 2 頭に第5群で発症したカニクイザル (#15) 10%脳乳剤を、脳内接種を行った。

脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml) 2 頭 (#22, 23)

脳内接種群 2 頭は発症後安楽死を行い検索に供した。

第7群：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。

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 2 mm の穿孔部を作製し、視床に脳乳剤 0.2 ml 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。

接種後、定期的に血液及び脳脊髄液 (CSF) 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。

安楽死は塩酸ケタミン筋肉内投与による麻酔後、ペントバルビタール静脈内投与による深麻酔下において放血後過剰量のペントバルビタールを投与により行った。

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. L 型非定型 BSE 感染サルの体液中の PrPSc 動態解析

定期的に採材された体液類 (尿、血液、脳脊髄

液および唾液)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。

(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收容した。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を入れ、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。

本動物実験計画は「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、基盤健康研動物実験委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

1) 臨床経過

C-BSE 接種群では、ウシ脳乳剤接種群 (初代) は 27~45 ヶ月の潜伏期を経て 7~14 ヶ月発症期間を要したが、2 代目、3 代目継代接種群では潜伏期間 13~18 ヶ月、発症期間 2~6 ヶ月と短縮し、再現性の高い発症経過を示した。臨床症状は、振戦、ミオクローヌス、小脳失調症状が顕著であったが、認知能は発症末期まで維持していた。L-BSE 接種群においては、初代より潜伏期間 19~20 ヶ月、発症期間 5 ヶ月と C-BSE より強い病原性を示し、2 代目では、潜伏期間 14~16 ヶ月、発症期間 6~10 ヶ月と潜伏期間はわずかに短縮された。L-BSE 接種群は C-BSE 接種群に比べ、発症からの症状進行が緩徐で、神経症状に先行して認知機能の低下が認められた。C-BSE ウシ脳乳剤経口投与群は接種後 12 年、L-BSE ウシ脳乳剤経口投与群は接種後 4 年以上を経過したが、未だ発症が認められていない。H-BSE ウシ脳乳剤を脳内接

種群及び経口投与各 2 頭のサルに行ったが、接種後 4 ヶ月経過時点では発症していない (図 1, 2)。

2) 連続 PMCA 法による BSE 感染サルの体液中の PrP^{Sc} 動態解析

現在経過観察を行っている C-BSE 経口投与群及び輸血投与群のカニクイザルから定期的に採材した尿、CSF、唾液及び血漿から連続 PMCA 法にて PrP^{Sc} の検出を試みた。経口投与後 11 年目、輸血後 8 年目のサンプルではいずれも連続 PMCA 法では PrP^{Sc} が検出出来なかった (図 3, 4)。

連続 PMCA 法による L-BSE 感染カニクイザル由来 PrP^{Sc} の最適な増幅条件がなかなか定まらなかったが、脳乳剤基質、超音波条件及びポリアニオンの選別に加え、プリオン蛋白質のフォールディングに影響を与える薬剤 (変性剤や安定化剤等) の効果を検討し、ポリアニオン存在下、アルギニンを基質に添加することで増幅効率が飛躍的に改善され、検出感度を約 10 万倍向上させることに昨年度、成功した。この検出系を用いることにより、L-BSE2 代目接種群 (#22, 23) の経時的に採取した発症前の体液サンプルから PrP^{Sc} が検出されたことを昨年度報告したが、今回は、L-BSE 経口投与群 (#18, 19) の経時的に採取した体液サンプルを同様に連続 PMCA 法で調べた。経口投与約 3.5 年後の #19 の唾液から PrP^{Sc} がラウンド 3 (R3) で検出された。しかしながら、同個体の同時期の CSF、血漿、白血球画分並びに #18 のサンプルからは PrP^{Sc} は検出されなかった (図 5)。

D. 考察

ヒトへの感染リスクを評価する上で経口接種群の実験は非常に重要であるが、C-BSE では 12 年、L-BSE では 4 年以上を経過したが、今のところ臨床症状は認められていない。しかしながら、超高感度検出系を用いて L-BSE 経口投与群 #19 の唾液から PrP^{Sc} が検出された。C-BSE 経口投与群は投与後 12 年以上経過し、体液類中には PrP^{Sc} は検出されていないが、投与 7.5 年経過した未発症サル (#6) 解剖時の神経リンパ節、脾臓や延髄等からは微量の PrP^{Sc} が検出されており、生着は確認されている。C-BSE と L-BSE の投与量が異なっているため、単純に比較出来ないが、脳内接種の感染実験同様、経口投与の感染実験においても、C-BSE に比べ早い段階で発症前の唾液から PrP^{Sc} が検出されたことにより、L-BSE の強い毒性が示唆された。フランスの研究グループが原猿類を用いた L-BSE 経口投与による感染を既に報告しているが、ヒトにより近縁な真猿類での感染の意義

は大きく、公衆衛生上、経口によるヒトへ L-BSE の伝播のリスクが示唆された。#19 の唾液からの検出はまだ one point しか確認しておらず、同個体の同時期の他の体液類、CSF 等にも検出されていないので、#18 のサンプルも含めて引き続き、確認、検証していく必要がある。なお、現在の処、唾液からしか PrP^{Sc} が検出されていない理由としては、幾つか考えられる。1) 最近、脳生検の代わりとして、プリオン病患者の嗅粘膜神経上皮細胞を採取して、PrP^{Sc}を検出する方法が報告されている。サルでも中枢から伝わった PrP^{Sc}を蓄積した鼻粘膜上皮が脱落して鼻腔から咽頭に落ちて、唾液中から検出された。2) 未発症のウシの骨格筋から PrP^{Sc}が検出されているので、末梢から咬筋等の骨格筋に蓄積した PrP^{Sc}が唾液腺を通じて検出された。現在、唾液からの PrP^{Sc} 検出の理由を突き止めるべく検証を考えている。遅れていた H-BSE の感染実験を今年度開始したが、引き続き、C-BSE 経口投与群、輸血群及び L-BSE 経口投与群の経過観察等も行い、ヒトへの感受リスクの比較等を行っていく。

E . 結論

カニクイザルへの L-BSE 経口投与群は投与後 4 年を経過したが、未だ発症していない。しかしながら、L-BSE 経口投与群 2 頭の内 1 頭のサルの投与 3.5 年後の唾液から PrP^{Sc} が検出された。L-BSE も経口によるヒトへの伝播リスクが示唆された。

H-BSE の感染実験を開始し、H-BSE におけるヒトへの感染リスクの評価を行っていく。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Murayama Y, Ono F, Shimozaki N, 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 470: 563-568, 2016.

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

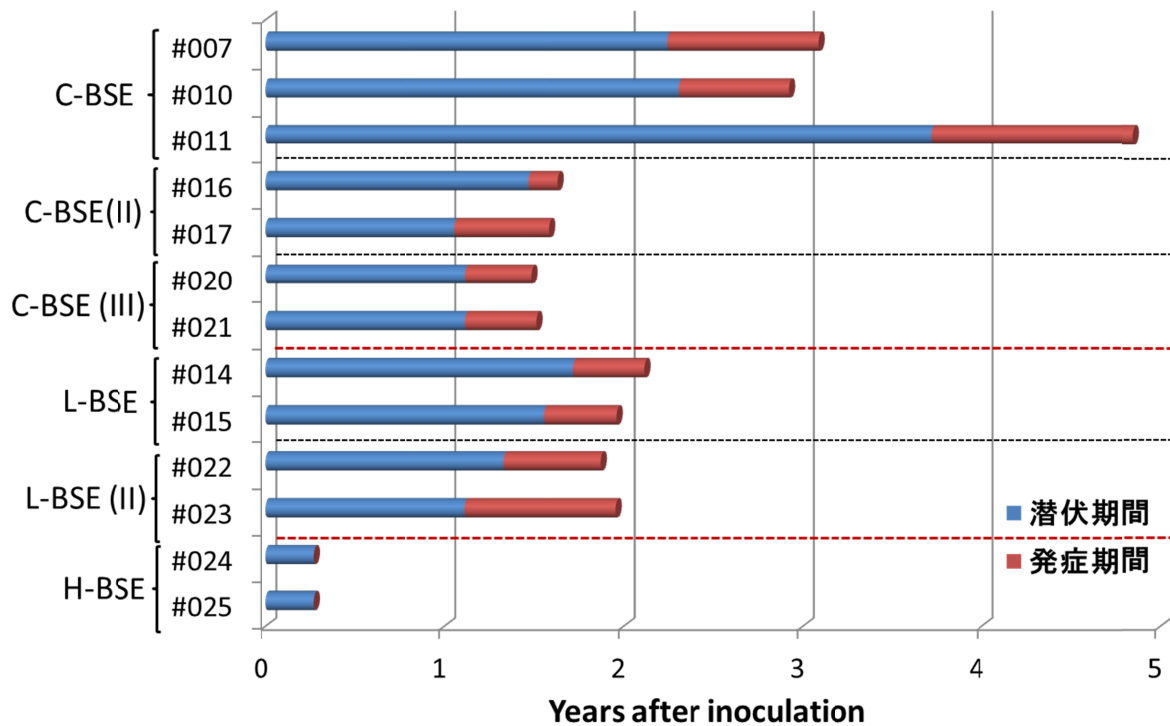


図1 . カニクイザル感染実験経過（脳内接種）

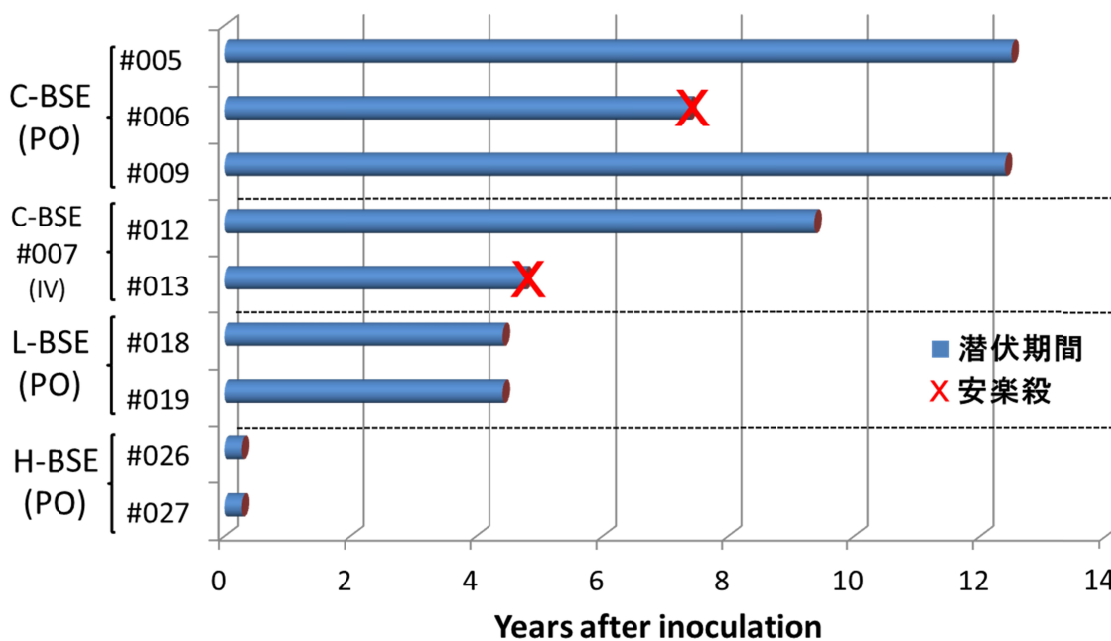


図2 . カニクイザル感染実験経過（経口投与、輸血接種）

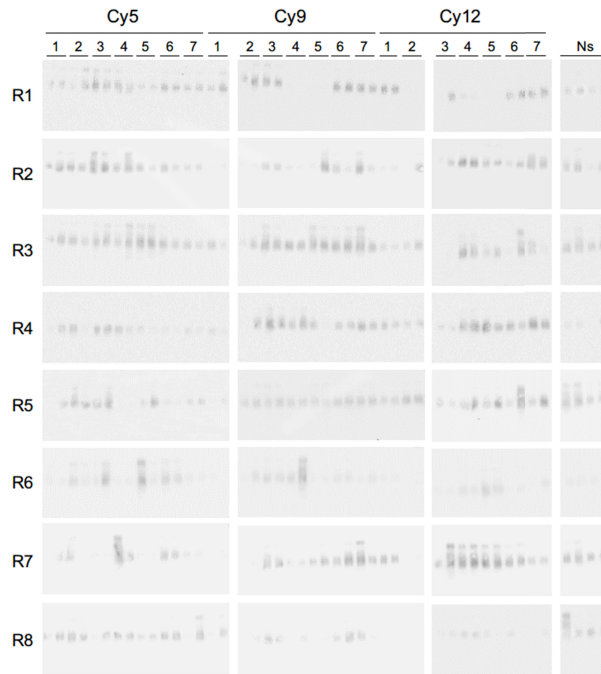


図3 . C-BSE 経口投与サル (Cy5&Cy9) および輸血サル (Cy12) の尿中 PrP^{Sc} 検出結果.

経口投与後約 11 年、輸血後約 8 年、7 時期 (1-7) に採材し、duplicate で連続 PMCA により増幅した。増幅産物を PK 消化後、Western blot により検出した。Ns は No seed samples (4 lanes).

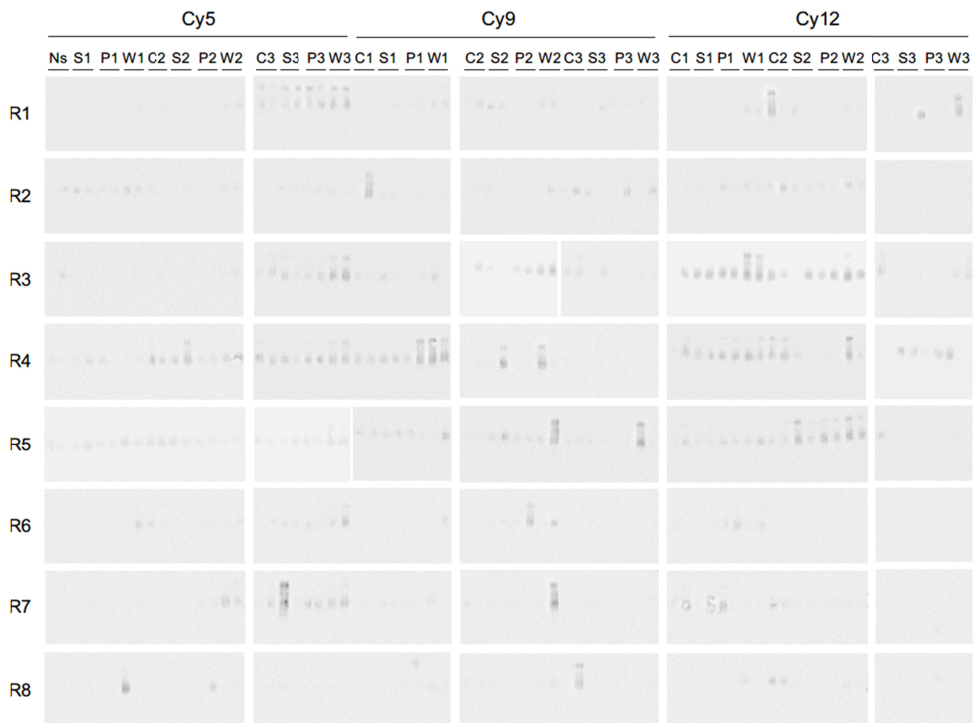


図4 . C-BSE 経口投与サル (Cy5&Cy9) および輸血サル (Cy12) の CSF (C) 唾液 (S) 血漿 (P) 白血球 (W) における PrP^{Sc} 検出結果.

経口投与後約 11 年、輸血後約 8 年後、3 時期 (1-3) に採材し、duplicate で連続 PMCA により増幅した。増幅産物を PK 消化後、Western blot により検出した。Ns は No seed samples (2 lanes).

図5. L-BSE 経口投与サル (Cy18&Cy19) の CSF 唾液 血漿 白血球 における PrP^{Sc} 検出結果.
経口投与後約 3 ~ 3.5 年、3 時期 (1-3) に採材し、duplicat で連続 PMCA により増幅した。増幅産物を PK 消化後、Western blot により検出した。他のサンプルは R8 まで陰性であった。

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) 本邦で確認された非定型 BSE 感染ウシ由来プリオン (L-BSE) 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。接種 1 代目および 2 代目 (継代接種) について比較検討し、継代における病理組織学的な特徴の維持について検討する。

2) L-BSE 接種サルの病理学的な特徴と、C-BSE 接種サルにおける病理組織学的特徴とを比較検討し、その病理学的な差異について検討する。

3) L-BSE 由来プリオンの生化学的特徴は、C-BSE 由来プリオンとは異なり、ヒト孤発性クロイツフェルトヤコブ病 (sCJD) の MM2 に分類される患者由来プリオンと類似したパターンを示す。このことから、プリオンの生化学的特徴と病理学的な特徴の相関について検討するため、ヒトプリオン病と L-BSE 感染サルの病理学的特徴について比較検討を行う。

(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) 継代 2 代目の L-BSE 接種サルの脳組織を病理学的に検討した結果、大脳皮質の高度の空胞変性及び皮質の萎縮を認め、シナプスタイプのプリオン沈着パターンを認めた。一方、小脳では初代接種と同様に髄質の空胞変性が高度であったが、分子層においてプラーク型の沈着も認められた (図 1)。中枢神経系以外の各臓器やリンパ組織へのプリオン沈着について検索したが、中枢神経系以外へのプリオン沈着は認められなかった。

2) C-BSE 罹患牛の脳乳剤を脳内接種したサルでは、大脳での空胞変性形成に加え、プラーク型のプリオン沈着を特徴とした (図 2 上段)。この特徴的なプリオンの沈着パターンは、感染サル脳組織を脳内へ接種する継代実験においても維持されていた (図 2 下段)。

L-BSE 感染サルの大脳では C-BSE 由来プリオン感染に比べ高度の空胞変性が誘導される一方、大脳でのプラーク型のプリオン沈着は認められず、シナプス型の沈着パターンを示した (図 1 上段)。この特徴は継代後も維持されていた (図 1 下段)。

3) ヒトプリオン病剖検例および文献的検索では、コドン 129M/M type1 型では、大脳の高度の空胞変性とシナプス型のプリオン沈着を特徴とした。しかしながら、小脳でのプラーク型の沈着は顕著ではなかった。ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker : GSS) (図 3) では、大脳及び小脳でプラーク型が顕著なプリオン沈着パターンを示した。硬膜移植や成長ホルモン投与に起

因する医原性プリオン病や C-BSE 由来プリオン摂取に由来する変異型 CJD(vCJD) (図3) などの獲得性プリオン病患者では、その原因や病型によってプリオンの沈着パターンは異なっていた。C-BSE プリオンを原因とする vCJD 患者では、大脳及び小脳でのプラーク型の沈着を特徴とした(図3)。

D. 考察

C-BSE 接種 1 代目では、発症後の経過は緩徐であり、ヒトで確認されている vCJD の病態推移と同様の経過であった。C-BSE 由来プリオンのサルでの継代においては、初代と同様にプラーク型の沈着を認めた。ヒト vCJD の輸血を介した水平感染例においても、大脳ではプラーク型のプリオン沈着を示すことが報告されており、サルでの継代実験が、vCJD の水平感染モデルとして有用なことが示された。ただし、脳内接種実験では、リンパ組織へのプリオン沈着は再現されず、経口および輸血による感染実験の必要性が示唆された。現在、経口および輸血を介した感染実験を遂行中である。

L-BSE 接種 1 代目サルの大脳組織の病理学的特徴は、高度の空胞変性とシナプスタイプのプリオン沈着であった。この病理学的特徴は、サルでの継代 2 代目においても維持されていた。L-BSE 感染サルは、発症後急速に進行する急性転帰をたどる。これは、1 代目及び 2 代目も同様で、大脳での高度の変性を有する所見と合致する。ヒトでもっとも典型的な 129M/M1 型の sCJD の病理像は、高度の空胞変性とシナプス型のプリオン沈着を背景とする。しかしながら、小脳でのプラーク型の顕著な沈着は M/M1 では認められず、M/V2 ないしは V/V2 で認められる(図4)。一方、硬膜移植や成長ホルモン投与等に起因する獲得性プリオン病では、亜急性の病態進行を呈する群では、大脳のシナプスタイプのプリオン沈着パターンを示すが、同時に顕著な小脳でのプラーク型沈着を示すものは認められなかった。緩徐な病態進行を示す獲得性プリオン病では、プラーク型の沈着を小脳に認めるが、同時に大脳にも認められた(図5)。以上から、L-BSE 感染サルは病理所見と合致する既存のヒトプリオン病は存在しないが、亜急性の病態進行と大脳でのシナプスタイプのプリオン沈着は sCJD との鑑別が困難であり、詳細な病理学的検索と生化学的検索がプリオン病の原因を推測うえで不可欠なことが示唆され

た。

E. 結論

C-BSE 由来プリオンのサルへの感染実験並びに継代実験から、サルを用いた感染実験系は、ヒトの vCJD およびその水平感染モデルとして有用なことが示された。このことから、L-BSE に由来するプリオンがヒトへ感染した場合、今回示した L-BSE 感染サルと同様の病理像を呈すると考えられた。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

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

☒ 1

☒ 2

図 3



図 4 クロイツフェルトヤコブ病 (sCJD) の特徴

Prion Disease codon129	sCJD MM1	sCJD MM2	sCJD MV1	sCJD MV2	sCJD VV1	sCJD VV2	L-BSE ic Macca MM
Disease Duration (months)	3.9	15.7	4.9	17.1	15.3	6.5	
Kuru cerebrum	-	-	+	-	+	+	-
PrP IHC cerebellum	Brush stroke-like	+/-	Brush stroke-like	Kuru+ Brush stroke-like	+/-	Kuru+ Brush stroke-like	Kuru + Brush stroke-like

図 5 ヒト獲得性プリオン病の特徴

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

5. 霊長類モデルへの伝播による非定型 BSE プリオンの蛋白質化学解析

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）

研究要旨

本研究班が進めている非定型BSEプリオンのカニクイザルへの伝播実験（脳内接種実験）のうち、非定型L-BSEプリオンの2継代目の感染ザルの経過追跡を2014年3月に終えた。感染ザルから得た組織材料について、昨年度に引き続き本年度もPrP^{Sc}の蓄積・分布の生化学分析およびサルプリオン蛋白質（PrP）のコード領域の遺伝子解析を行い、データの精緻化を図った。また、昨年度に分析結果が判然とせず再検討が必要となった脾・扁桃の分析を行った。この課題とは別に、本邦のBSEスクリーニング検査で使用中の迅速ELISAキットが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ることを昨年度に示したが、本年度は迅速キットがH-BSE罹患ウシの摘発にも同じく有効であることを示す評価データを収集した。

A. 研究目的

非定型 L-/H-BSE プリオンがヒトへ伝播したという事例はこれまで知られていないが、L-BSE プリオンはカニクイザルへ実験的伝播が可能である（Ono, F., et al., Jpn. J. Infect. Dis. 64: 81-84, 2011）。ヒトが L-BSE プリオンに暴露・感染した場合を想定したモデルとして、本研究では昨年度に引き続き、非定型 L-BSE プリオンを脳内接種・伝播させたカニクイザルについて、PrP^{Sc} の蓄積・分布を従来型 BSE（C-BSE）プリオン伝播ザルと比較することにより、霊長類モデルで増殖する C-/L-BSE プリオンの特性について知見を深めることを目的とした。並行して、これまでの研究班での実験に供したカニクイザル個体の PrP について、アミノ酸変異の有無を確認するために PrP コード領域の DNA 塩基配列を分析した。

また、食肉衛生検査所で用いられている BSE 迅速検査キットについて、昨年度に非定型 L-BSE 罹患ウシの摘発に対する有効性を示したが、本年度は非定型 H-BSE 罹患ウシの摘発にも迅速キットが有効であることを調査することを目的とする評価研究を行った。

B. 研究方法

1) カニクイザルの PrP 遺伝子の解析

昨年度の DNA 精製プロトコール（DNA 精製の途上で塩酸グアニジンを含む）を改良し、プリオンの感染力価をさらに低減させるためにチオシアン酸グアニジン処理を精製途上で含むようにした。即ち、冷凍保管したサル各個体の組織片を出発材料として、NucleoSpin Tissue XS（Macherey-Nagel 社）を用いてゲノム DNA を調製した（第1段階）。得られる DNA 溶液にチオシアン酸グアニジン（終濃度 4M）を添加し、40℃にて5時間加温処理した。処理後の DNA 溶液に等容量のエタノールを添加し、再度、NucleoSpin Tissue XS のシリカカラムへアプライし、カラムを洗浄後、ゲノム DNA を精製水にて溶出・回収した。本法によるゲノム DNA の回収率は昨年度のプロトコールよりも若干低くなる傾向があったが、収率の低減がその後の分析操作に支障を及ぼすことはなかった。得られるゲノム DNA を鋳型として、primer-1: 5'-TTCATCAAGTCCATAACTTAGGGT CAG-3'、primer-2: 5'-CCTATCAGGGACAAAGAG AGAAGCAAG-3'、および KOD plus polymerase を用いた PCR により、PrP コード領域を含む（-339～+883）DNA 断片を得た。この DNA 断片（PCR 産物）から 1 本鎖 DNA を調製し、dideoxy 法により塩基配列分析を行った。

2) L-BSE プリオンの初代伝播および2代目伝播カニクイザル脳組織等に蓄積する PrP^{Sc} の生化学分析

L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルの初代伝播個体 (#015)、および2代目伝播個体 (#022、#023) について、脳、延髄、橋、脊髄、脾臓、扁桃の各部位の PrP^{Sc} の蓄積量をウエスタンブロット法により調べた。また、糖鎖型などの PrP^{Sc} の生化学的特徴および proteinase K 消化に対する抵抗性を調べた。対照検体として、従来型 BSE (C-BSE) プリオンを脳内接種したカニクイザルの初代伝播個体 (#007)、および2代目伝播個体 (#017) を用いて比較した。

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 スクリーニングに使われている現行キット1点(ニッピールBSE)が、H-BSE プリオン罹患ウシの摘発にも有効であるかという点についての評価試験を動物衛生研究所との共同で行った。試験検体は、H-BSE プリオンの実験感染牛に由来する脳組織を用いた。欧州およびカナダで実施された試験の方法 (PlosOne, 7, e43133 (2012); J. Vet. Diagn. Invest. 24, 976 (2012)) を参考にし、感染ウシ脳ホモジネートの2倍希釈系列を健常ウシ延髄ホモジネートにスパイクしたものを試験検体とした。

(倫理面、バイオセーフティ等への対応)

プリオンの取扱い・分与については、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定、分与・輸送に関する規定、ならびに医薬基盤・健康・栄養研究所および動物衛生研究所が定める規定および指針を遵守した。動物への感染実験は、動物実験実施機関(医薬基盤・健康・栄養研究所)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) カニクイザルの PrP 遺伝子の解析結果

PrP コード領域を含む全長 1.2kbp (-339~+883) の DNA 断片の塩基配列分析を行った。昨年度までに8頭(#007、#010、#011、#014、#015、#016、#022、#023)の分析を行った。本年度はこれらの個体および昨年度に解析未了の3頭(#017、#020、#021)について各個体につき複数回の解読を行い、表1のとおり塩基配列情報を決定した(昨年度に解読した配列の一部に誤りをみとめたので、こ

れらは表1に示すように訂正する)。分析の結果、幾つかのコドン多型が検出されたが、いずれもアミノ酸変異を生じないサイレント変異だった[表1]

2) カニクイザル脳組織等に蓄積した PrP^{Sc} のウエスタンブロット分析

脳：昨年度の分析を継続してデータの精緻化を図った。その結果、昨年度の初期解析で報告したとおり、L-BSE プリオンの初代伝播(#015)および2代目伝播ザル(#022、#023)では大脳の各部位に比して小脳、橋、延髄の PrP^{Sc} 蓄積レベルが低く、一方、C-BSE プリオンの初代伝播(#007)および2代目伝播ザル(#017)では PrP^{Sc} が小脳、延髄にも比較的多く蓄積することが再度確認された[図1]。すなわち、カニクイザルを感染宿主とし、プリオンの脳内接種という実験条件下においてはC-BSE プリオンとL-BSE プリオンの組織分布のトロピズムに違いがあることが明らかになった。

なお、接種材であるC-BSEおよびL-BSE罹患ウシの脳ホモジネートにはC型/L型のウエスタンブロット像の特徴(PrP^{Sc}の糖鎖型比および無糖鎖型 PrP^{Sc}の SDS-PAGE での移動度)が認められるが、伝播後のカニクイザル脳ではこの特徴の相違が曖昧化した。一方、C-BSEとL-BSE罹患ウシ由来の PrP^{Sc} では、C-BSE に比べてL-BSEの PrP^{Sc} は proteinase K 消化への抵抗性が弱いことが知られている (Jacobs, J.G., et al., J. Clin. Microbiol. 45: 1821-1829, 2007)。そこで、伝播ザル脳の PrP^{Sc} の proteinase K 消化に対する抵抗性を調べたところ、L-BSE プリオン伝播ザル脳の PrP^{Sc} はC-BSE プリオン伝播ザルのそれよりも proteinase K 消化に対する抵抗性が弱かった[図2]

脊髄：脊髄の組織重量あたりの PrP^{Sc} 蓄積レベルを調べたところ、L-BSE プリオン伝播ザル(#022、#023)はC-BSE プリオン伝播ザル(#016、#017)のほぼ半量の PrP^{Sc} を蓄積していることがわかった。特徴的な点として、C-BSE プリオン伝播ザル(#016、#017)では脊髄の肥大部である頸部・腰部の組織重量あたりの PrP^{Sc} 量が多かったが、L-BSE プリオン伝播ザル(#022、#023)では脊髄頸部・胸部・腰部で組織重量あたりほぼ同レベル量の PrP^{Sc} が検出されるという相違が認められた[図3]

脾・扁桃：L-BSE プリオンの初代伝播ザル(#014、#015)では、ウエスタンブロット法を用

いても脾および扁桃は PrP^{Sc} 陰性だった (Ono, F., et al., Jpn. J. Infect. Dis. 64: 81-84, 2011)。今回、L-BSE プリオンの 2 代目伝播ザル (#022、#023) について調べたが、2 代目継代を経ても脾および扁桃の PrP^{Sc} 量はウエスタンブロット法の検出限界以下の陰性だった。

3) 迅速 ELISA キットの性能評価

昨年度に実施できなかった H-BSE プリオンに対する評価試験を実施した。国内での H-BSE 罹患ウシの野外例 (自然例) は無いため、H-BSE プリオンを実験的に感染させたウシの脳組織を試験検体とした。試験の結果、現行の迅速検査キット (ニッピール) において脳組織の最大 2⁴ 希釈まで ELISA 陽性判定値が得られた。昨年度の C-BSE および L-BSE プリオンに対する評価試験の結果と合わせて、現行の BSE スクリーニング検査が従来型 BSE 罹患ウシとともに非定型 L-/H-BSE 罹患ウシの摘発にも同じく有効であることがわかった。(試験検体として用いた H-BSE プリオン含有脳中の PrP^{Sc} 量が未定量のため、近々にウエスタンブロット法により確認する。模擬検体として適切な PrP^{Sc} 量を含むと予測している)。

D. 考察

本研究班で推進するカニクイザルへの C-/L-BSE プリオンの一連の感染実験では、プリオンの感受性に影響を及ぼす PrP のアミノ酸配列情報は重要である。これまでの感染実験で安楽殺に処した各個体について PrP の遺伝子解析を行い、アミノ酸に置換が無いことを確認した。いずれの個体も、クロイツフェルト・ヤコブ病との関連が指摘されているヒトの 129 番目のアミノ酸に対応するカニクイザル配列上のアミノ酸は Met/Met、ヒトの 219 番目のアミノ酸に対応するサル・アミノ酸は Glu/Glu だった。

並行して、BSE プリオンのカニクイザルへの伝播実験により本年度までに得た組織材料について、ウエスタンブロット法により PrP^{Sc} を検索した。昨年度報告書に「(昨年度は)未だ初期分析の段階につき、今後、別の抗 PrP 抗体を使用するなど、異なる分析条件下での再現性を確認したい」と記した点を踏まえて、解析を進めた。その結果、脳組織での PrP^{Sc} の分布には C-/L-BSE プリオン感染ザル間での違いが再確認できた。新たな知見として、C-/L-BSE プリオン感染ザル間では脊髄の高さ(頸・胸・腰)による組織重量あたりの PrP^{Sc}

量に特徴的な相違があることがわかった。また、昨年度の分析では、L-BSE プリオンを脳内接種したサル個体の脾臓および扁桃はおそらく PrP^{Sc} 陰性と考えられたが、最終結論に至っていなかった。本年度の再検討により、脾および扁桃はウエスタンブロット法の検出感度では PrP^{Sc} 陰性と結論された。脳や脊髄での PrP^{Sc} の分布・広がりの違いが何に起因するのかわからないが、霊長類モデルで示されるこのような特徴は、既知あるいは未知のヒト・プリオン病と非定型 L-BSE との関連について考察を進める上で興味深い知見と思われる。以上の実験結果は、本研究班で別途に調べられている剖検病理像、ならびに感染ザルの経過観察中に認められた神経症状や運動失調などの所見と照らし、今後、統合的に整理したい。なお、接種材であるウシ脳では判別できた C-/L-の PrP^{Sc} のウエスタンブロット像の相違は、カニクイザルへの伝播により曖昧化した。しかし、カニクイザル伝播後の PrP^{Sc} について proteinase K 消化に対する抵抗性を調べたところ、両者は接種材のウシ脳ホモジネートについて既に調べられている proteinase K 抵抗性と同様の傾向を保っていることがわかった。このことは、ウエスタンブロットの見かけ上の相違の曖昧化にも拘わらず、カニクイザル伝播によっても接種材の C 型/L 型の性状(多分に高次構造に帰すると考えられる)は受け継がれていることを示唆する。

また、昨年度に未完であった迅速 ELISA キットの H-BSE プリオンに対する評価試験を行い、食肉衛生検査所等での現行の BSE スクリーニング検査が従来型 BSE 罹患ウシとともに非定型 L-/H-BSE 罹患ウシの摘発にも同じく有効であることがわかった。迅速キットが C-/L-/H-BSE を適正に摘発する性能を有することが示されたことは、近年の国内の食肉衛生検査所等での BSE 摘発例が無いという事象を正當に解釈する上で意義深い。

E. 結論

本年度は昨年度に未完だった以下の解析を進め、成果を得た、

- ・本研究に供したサルの PrP 遺伝子の塩基配列の決定
- ・C-および L-BSE プリオン伝播ザルの神経組織における PrP^{Sc} の分布についての複数種の抗 PrP 抗体を用いた比較解析; 脾・扁桃の PrP^{Sc} 蓄積量の定量分析

- ・ C-および L-BSE プリオン伝播ザルの PrP^{Sc} の proteinase K 抵抗性の比較
- ・ 食肉衛生検査所等での BSE スクリーニング検査に使用されている現行の迅速 ELISA キットが、H-BSE 罹患ウシの摘発にも有効であることを示すデータの収集

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
無し

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

表 1 PrP 遺伝子の解析結果

個体 #	伝播実験	コドン (いずれもアミノ酸の変異は生じない)
7	C-BSE プリオン 初代伝播	Y145=TAT/TAC、Y163=TAT/TAC、-121 塩基 (イントロン領域) =G/A
10	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
11	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
16	C-BSE プリオン 2 代目伝播	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致 -132 塩基 (イントロン領域) =T/T
17	同上	P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC、T192=ACT/ACC
20	C-BSE プリオン 3 代目代伝播	-121 塩基 (イントロン領域) =G/A、-25 塩基 (イントロン領域) =T/C
21	同上	-25 塩基 (イントロン領域) =T/C
14	L-BSE プリオン 初代伝播	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
15	同上	P39=CCA/CCG*、C179=TGT/TGC*、T192=ACT/ACC*
22	L-BSE プリオン 2 代目伝播	Ensemble データベース ENSMMUG00000019949 に一致
23	同上	P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC、T192=ACT/ACC [§]

* ; 昨年度報告書では、P39=CCA、C179=TGT、T192=ACT と記載したが、複数回の再分析の結果、本表の遺伝子型と解釈された。

§ ; 昨年度報告書では、P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC と記載したが、複数回の再分析の結果、本表の遺伝子型と解釈された。

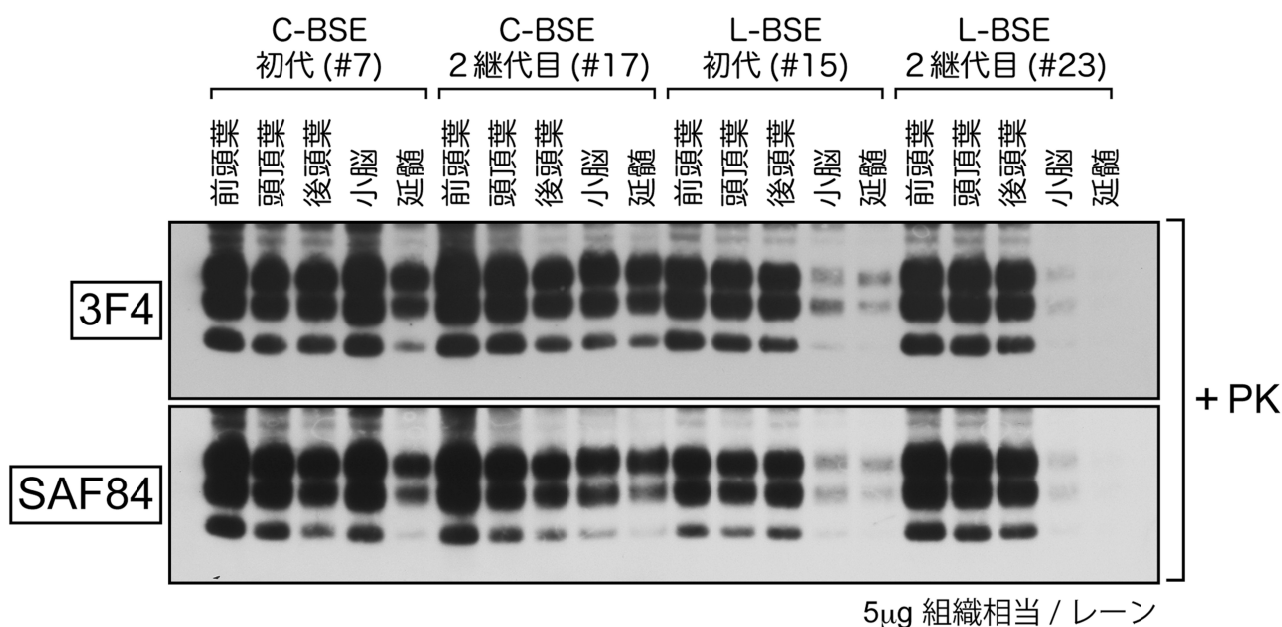


図 1 脳での C/L-BSE プリオン PrP^{Sc} の蓄積の比較

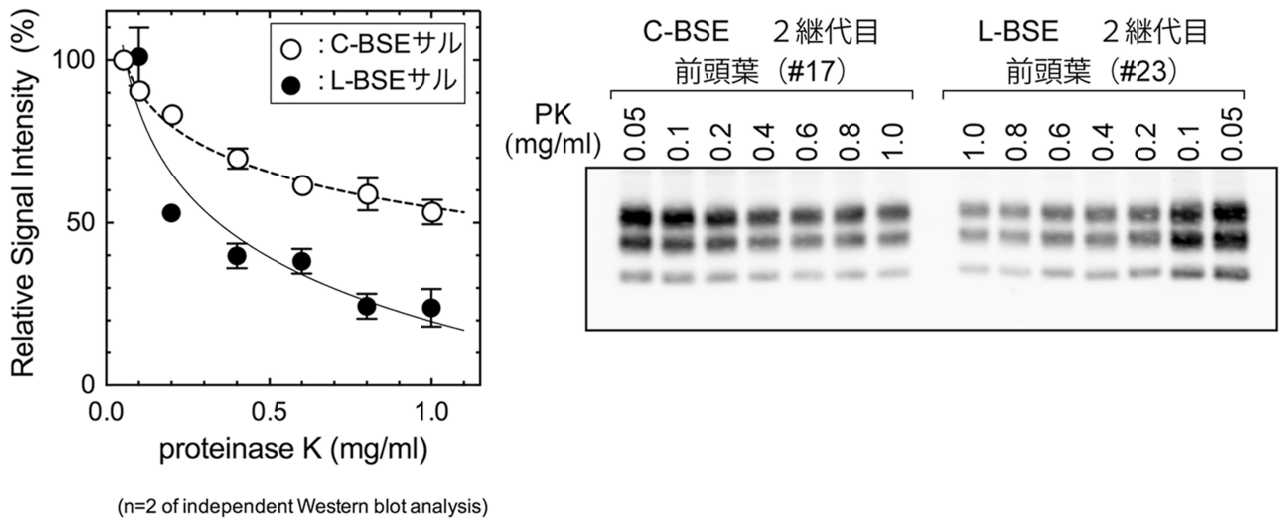


図2 カニクイザル伝播後の C-/L-BSE プリオン PrP^{Sc} の PK 抵抗性

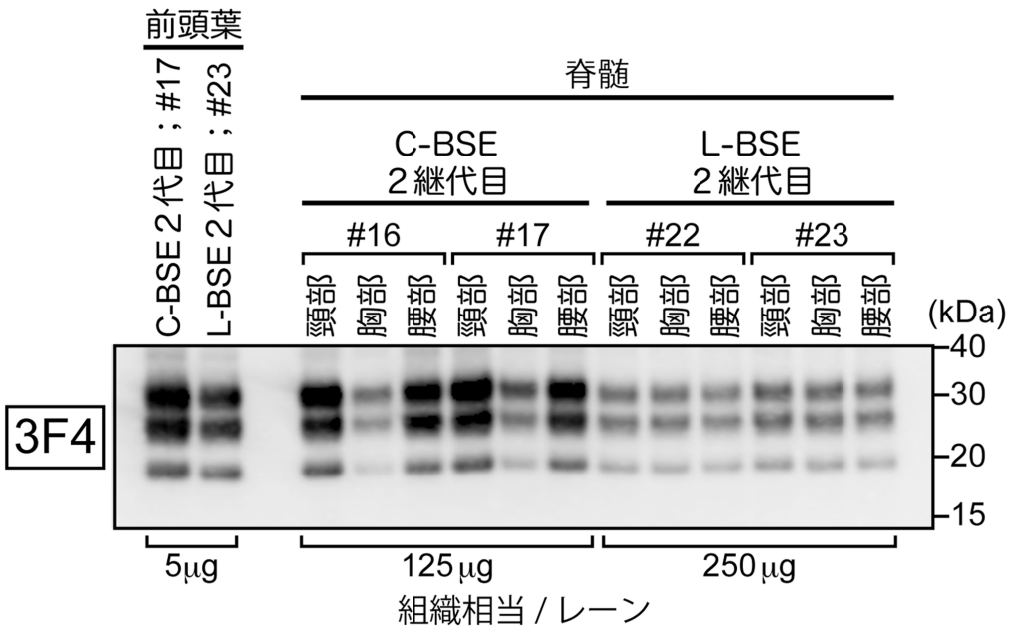


図3 脊髓での C-/L-BSE プリオン PrP^{Sc} の蓄積の比較

6. 異なるエピトープを認識する2種の抗PrP抗体を用いた免疫染色によるL型BSE感染牛脳組織のPrP^{Sc}の検出

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

抗マウスPrPモノクローナル抗体(mAb)132はマウスPrPの119-127番目のアミノ酸を認識し、プリオン感染細胞およびマウスの脳組織をグアニジンチオシアン酸(GdnSCN)で前処理することによりPrP^{Sc}を特異的に検出することができる(Yamasaki et al., 2012; Sakai et al., 2013)。また、近年報告された抗PrP mAb8D5はマウスPrPの31-39番目のアミノ酸を認識し、GdnSCNによる前処理なしでプリオン感染細胞からPrP^{Sc}を検出できる(Masujin et al., 2013. Tanaka et al., submitted)。本研究では、L型(L-)BSE感染138日目の牛2頭(No. 6981, No. 7018)の脳組織において、mAb132とmAb8D5を用いた免疫染色により、PrP^{Sc}を検出することを試みた。No. 6981では、橋にmAb8D5により線維状の構造物が検出され、視床下部の少数の細胞の細胞質にシグナルが検出された。No. 7018では、橋および視床の少数の細胞の細胞質にシグナルが認められた。mAb132によるシグナルは認められなかった。No. 6981でmAb8D5により検出された線維状構造物はプリオン感染マウスの脳で検出されるPrP^{Sc}とは形態が異なり、PrP^Cを検出している可能性も考えられた。

A. 研究目的

従来、脳組織のPrP^{Sc}を検出する方法として、パラフィン包埋切片を高圧蒸気処理をした後に免疫染色をする方法が行われてきた。また、プリオン感染細胞でPrP^{Sc}を検出する方法として、プロテアーゼ(PK)とグアニジン塩酸で処理をした後に免疫染色をする方法が行われてきた。しかしながら、これらの方法は、組織や細胞に大きな傷害を与えるため、抗体の反応性に影響を与えてしまう可能性は否定できない。当研究室で確立したmAb132を用いたPrP^{Sc}特異的免疫染色では、5M GdnSCNの前処理によりPrP^CとPrP^{Sc}を区別できるため、高圧蒸気処理やPK処理後では検出できないPrP^{Sc}を検出できる可能性がある(Yamasaki et al., 2012; Sakai et al., 2013)。また、近年報告されたmAb8D5は、PrPのN末端を認識し、PK処理およびGdnSCN処理をせずにプリオン感染細胞においてPrP^CとPrP^{Sc}を区別することができる(Masujin et al., 2013; Tanaka et al., submitted)。これらの異なるエピトープを認識する2種の抗PrP抗体を用いることで、より多くのPrP^{Sc}分子種を検出することが可能になることが期待される。本研究では、プリオン感染マウス脳の凍結切片でmAb132とmAb8D5の二重染色によりPrP^{Sc}を検出する方法を検討した。

BSEは1986年に英国で最初に報告されて依頼、単一の株により引き起こされるものと考えられてきた。しかしながら近年、従来のBSEとは生化学的、生物学的に異なる性質を示す非定型BSE(H型、L型)が世界各地で報告されており、日本でもL型が2件報告されている(Yamakawa et al., 2003; Biacabe et al., 2004; Casolone et al., 2004; Hagiwara et al., 2007; Dudas et al., 2010)。定型および非定型BSE感染牛脳組織におけるPrP^{Sc}の分布はパラフィン包埋切片の免疫染色やPK処理後にイムノプロットまたはELISAでPK抵抗性PrP^{Sc}を検出することにより行われてきた(Nentig et al., 2007; Fukuda et al., 2009; Balkema-Buschmann et al., 2011; Porcario et al., 2011; Fukuda et al., 2012)。本研究では、非定型BSE感染牛脳組織におけるPrP^{Sc}の分布について新たな知見が得られることを期待して、mAb132とmAb8D5を用いた二重染色によるL-BSE感染牛脳組織のPrP^{Sc}検出を試みた。

B. 研究方法

1) 脳組織の凍結材料の作製

L-BSE感染138日目の牛2頭(No. 6981, No. 7018)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。切り出した脳を凍結組織切片作製用包埋材(サクラ

ファイナテックジャパン) に包埋し、-80 で凍結した。免疫染色の陽性対照として、Obihiro 株感染 120 日目の ICR マウス脳組織を、陰性対照として非感染 ICR 脳組織を用いた。凍結材料はクリオスタットを用いて 10 μ m の厚さに薄切した。

2) 蛍光標識 mAb132 と mAb8D5 の調整

mAb 132 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 標識 mAb 132 は Alexa Fluor 488 Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) を、Alexa Fluor 555 標識 mAb 8D5 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 Alexa 488 標識抗パルボウイルス mAb P2-284 を用いた。

3) mAb132 と mAb8D5 による免疫染色

脳組織切片を 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。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) により洗浄し、0.1% Triton X-100-PBS を室温で 5 分間反応させた。PBS により洗浄した後、mAb132 による染色では、5M GdnSCN を室温で 10 分間反応させた。PBS により洗浄した後、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 488 標識 mAb132 または Alexa Fluor 555 標識 mAb8D5 を 0.5% FBS-PBS 中それぞれ 1.5 μ g/ml、24 μ g/ml に調整し、4 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 を反応させ、PBS 洗浄後、4% PFA により室温で 10 分間固定した。PBS 洗浄後、5M GdnSCN を室温で 10 分間反応させ、PBS で洗浄した。5% FBS-PBS により室温で 30 分間ブロッキングし、Alexa 488 標識 mAb132 を 0.5% FBS-PBS 中 1.5 μ g/ml に調整し、4 で 1 晩反応させた。PBS 洗浄後、DAPI で核を染色し、封入した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1) mAb132 と mAb8D5 による二重免疫染色の条件検討

mAb132 と mAb8D5 による二重免疫染色の条件を検討するために、Obihiro 感染または非感染 ICR マウスの脳切片を用いた。染色条件として GdnSCN 処理後、mAb 132 と mAb 8D5 を反応させ

る方法、mAb 8D5 を反応させた後に、PFA で固定、GdnSCN 処理をし、mAb132 を反応させる方法を検討した。条件 1 では、二重染色は単染色と比較して mAb8D5 の染色性が弱くなる傾向にあった (図 1A)。その理由として GdnSCN 処理によりエピトープが変性し、抗体の反応性が弱くなった可能性が考えられた。条件 2 では、単染色と比較して mAb8D5 の染色性が変わらなかったことから、より適した条件であると考えられた。

2) mAb132 と mAb8D5 二重染色による L-BSE 感染牛脳組織の PrP^{Sc} の検出

1) で確立した染色条件を用いて、L-BSE 感染牛脳組織より PrP^{Sc} の検出を試みた。No. 6981 では、mAb8D5 により橋の一部に長い線維状の構造物が検出され、視床と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 2A)。No. 7018 では橋および視床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 2B)。mAb132 およびアイソタイプ抗体によるシグナルはいずれの牛の視床、視床下部、橋でも認められなかった。

D. 考察

プリオン感染マウスの脳で mAb132 と mAb8D5 により検出される PrP^{Sc} は、点状または短い糸状のものが塊となったような構造物であり、核周囲の細胞質にはほとんど認められなかった。それに対し、L-BSE 感染牛の脳で検出された mAb8D5 のシグナルは、長い線維状の構造物として認められ、中間径フィラメントに類似した形態であった。mAb8D5 のシグナルはまた、核周囲の細胞質に均質に認められた。これらのシグナルは PrP^C である可能性、または脳の特定の部位に mAb8D5 が反応するタンパク質が存在する可能性も否定できない。これらのシグナルが PrP^{Sc} であるかを確認するためには、同年齢の非感染牛の脳組織と比較する必要がある。また、今回解析したのは感染 138 日目と感染早期であるため、異なる感染時期の脳組織も解析する必要がある。

E. 結論

感染 138 日目の L-BSE 感染牛の脳組織において、mAb8D5 と mAb132 を用いた免疫染色では、明らかな PrP^{Sc} を検出することはできなかった。

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) 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 での染色像。(B) 条件 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。

(A)

(B)

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 から 150 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

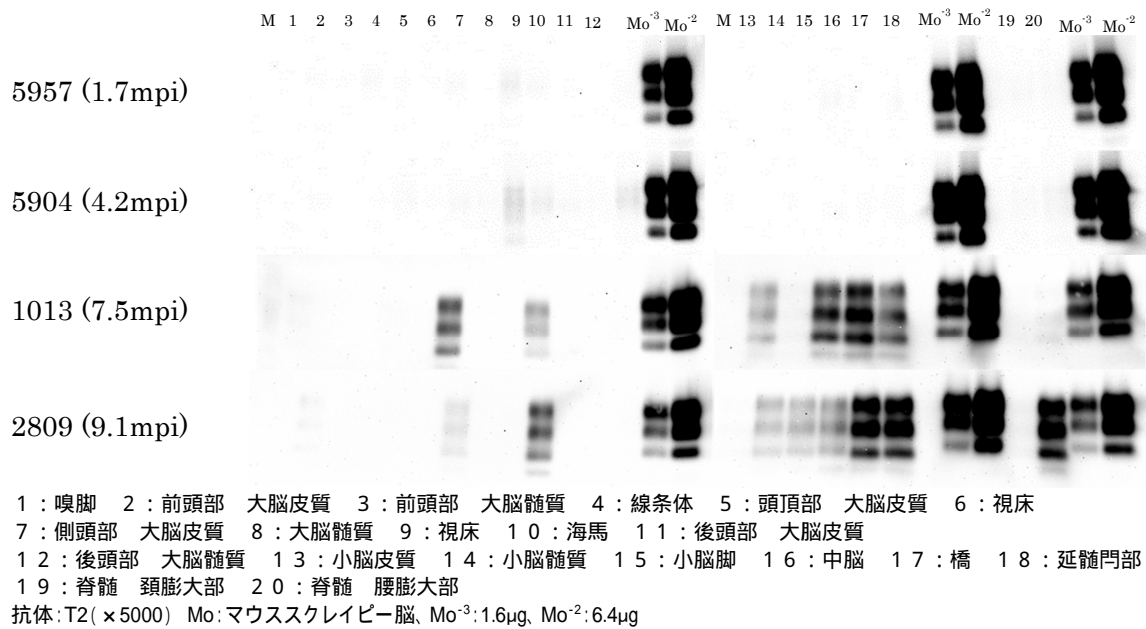


図1 未発症期に解剖した非定型L型BSE感染牛の脳および脊髄のWB法によるPrP^{Sc}解析

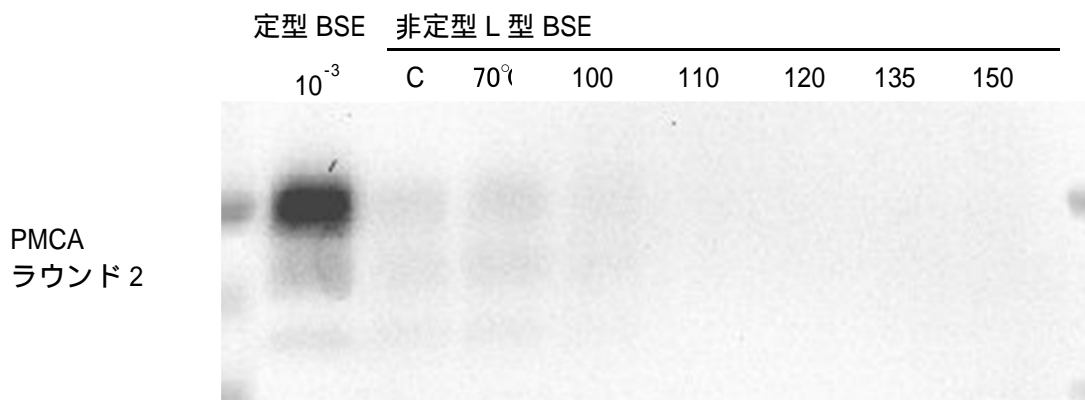


図2 加熱処理した非定型L型BSE感染脳を定型BSEのPMCA法によりPrP^{Sc}増幅

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広がった。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

が示唆されており、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 PBS10 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} のびまん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、小脳髄質、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} の沈着が広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ブ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 髄質	+	++	++	++	+	++	++	++
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 髄質	+	+	+	++	++	+	++	+
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 感染牛脳の内投与したウシ型 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 ウシ脳の内投与したウシ型 Tg マウスへ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

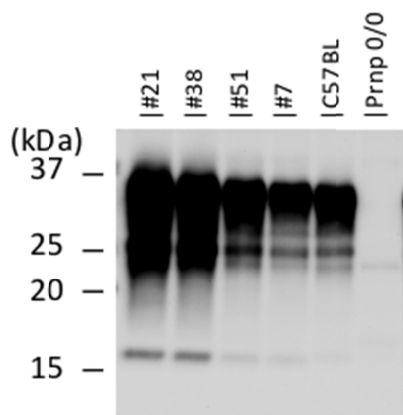


図 ウェスタンブロット法でのヒト型Tgマウス脳中のPrPC発現比較

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。

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。