

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等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と  
低減に資する研究

令和4年度 総括・分担研究報告書

令和5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院)

令和4年度 食品の安全確保推進研究事業  
「非定型BSE等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究」  
班員名簿

堀内 基広	北海道大学 大学院獣医学研究院	教授
新 竜一郎	宮崎大学 医学部 感染症学講座	教授
小野 文子	岡山理科大学 獣医学部 獣医保健看護学科	准教授
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	主任研究官
古岡 秀文	帯広畜産大学 畜産学部 基礎獣医学研究部門	教授
宮澤 光太郎	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門	グループ長補佐

## 目次

I.	総括研究報告書（令和4年度） 非定型BSE等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究・・・	2
	研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
II.	分担研究報告書	
1.	RT-QuIC法の阻害物質の除去法の検討・・・	10
	研究代表者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
2.	L非定型BSE感染サルのプリオン体内分布の解析、PMCA法を用いた 試験管内C-BSE出現の解析・・・	17
	研究分担者 新 竜一郎（宮崎大学・医学部）	
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・・・	23
	研究分担者 小野 文子（岡山理科大・獣医学部）	
4.	非定型BSE感染カニクイザルの病理学的解析・・・	28
	研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）	
5.	H-BSEプリオンのカニクイザルへの初代伝播実験の生化学解析および サル馴化C-BSEプリオンが持続感染可能な培養細胞の開発・・・	31
	研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）	
6.	異種間交差伝達によるプリオンの性状変化及びプリオン株に依存した ニューロンの選択的傷害に関する研究・・・	37
	研究分担者 古岡 秀文（帯広畜産大学・畜産学部）	
7.	PMCA法によるL-BSE実験経口感染牛におけるプリオン体内分布の解析 およびヒト型プリオンタンパク質遺伝子発現マウスを用いた動物由来プリオンの ヒトへの伝達リスクの推定・・・	44
	研究分担者 宮澤 光太郎（農研機構 動物衛生研究部門）	
III.	研究成果に関する刊行一覧表・・・	50

# I. 総括研究報告書

令和4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等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究  
(20KA1003)

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究院 教授

研究要旨

英国で発生して世界に拡散した定型BSE (C-BSE) は、飼料規制等の管理措置により発生は制御下にある。しかし、病型が異なる非定型BSE (L-およびH-BSE) が世界各地で摘発され、依然不安視されている。ヒツジのスクレイピーは、病原体“プリオン”に多様性があり、ヒトに感染しうるプリオン株の存在は否定できない。鹿科動物の慢性消耗病 (CWD) は、2016年以降、北欧3国で発生が報告され、感染拡大が懸念されている。2018年にはアルジェリアでラクダのプリオン病が報告された。このようにC-BSE発生収束後も、動物プリオン病は発生しており、ヒトの健康危害の懸念が絶えない。最近、非定型スクレイピーがC-BSEの起源となることが報告された (Huor et al., PNAS, 2019)。プリオン病は致死性の神経変性疾患で治療法がないため、C-BSE再興の防止、並びに非定型BSEを含め動物プリオン病のヒトへの感染リスクの低減を目的とした管理措置は依然として食の安全性を確保する上で重要である。本年度は、非定型BSE等の動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究を進め、以下に挙げる成果を得た。1) ブタノール/メタノールによるワンステップ脂質除去法が、各種プリオンを検出するReal-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) の試料前処理法として有用であることを示した。2) L-BSEプリオンのウシ間での経口伝播の効率は極めて低い経口ルートで感染が成立すると結論付けた。3) 経口接種サルでの体液からRT-QuICにより微量のプリオンが検出されたことから、L-BSEプリオンは経口接種によりサル類に感染が成立することが示された。4) 一方、H-BSEプリオンを脳内あるいは経口投与したカニクイザルは、これまでに接種後4年10ヶ月から6年1カ月に安楽死して病理学的および生化学的解析を行ってきたが、伝達を示す証拠は得られず、カニクイザルに感染が成立しないと結論した。5) BSEの伝播性等を解析可能なex vivoツールとして、サル馴化C-BSEプリオンが持続感染するIMR32ヒト神経芽細胞種由来の培養細胞を作出した。6) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤にH-BSE様プリオンが含まれている可能性、また、CWD感染シカ脳乳剤にC-BSE様プリオンがごく微量存在する可能性が示唆された。7) ヒトプリオンタンパク質遺伝子過発現マウス (TgHu129MM) を用いた感染実験から、非定型スクレイピープリオンおよび北米由来のCWDプリオンのヒトへの伝播リスクは極めて低いことが示唆された。8) Huorら (2019) が報告した非定型スクレイピープリオンのウシへの異種間伝達によるC-BSEプリオンの出現は再現できなかった。

研究分担者

教授)

新 竜一郎 (宮崎大学・医学部・感染症学講座

小野 文子 (岡山理科大学・獣医学部 准教授)

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 主任研究官)

古岡 秀文 (帯広畜産大学・畜産学部・基礎獣医学研究部門 教授)

宮澤 光太郎 (国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 主グループ長補佐)

## A. 研究目的

1980年代半ばに出現した牛海綿状脳症 (C-BSE) は、変異クロイツフェルトヤコブ病 (vCJD) を引き起こし、世界的に公衆衛生上の脅威となった。食用に供される牛の特定部位の除去、動物由来飼料の使用規制等のリスク低減措置により、vCJD と C-BSE の発生は収束している。一方、非定型 BSE (H-BSE と L-BSE) は高齢牛で孤発する可能性があり、C-BSE の起源となる可能性も指摘されている。ヒツジのスクレイピーは、病原体“プリオン”に多様性があり、ヒトに感染しうるプリオン株の存在は否定できない。鹿科動物の慢性消耗病 (CWD) は、北米と韓国で発生していたが、2016年以降、北欧3国で発生が報告され、感染拡大が懸念されている。2018年にはアルジェリアでラクダのプリオン病が報告された。このように C-BSE 発生収束後も、動物プリオン病は発生しており、ヒトの健康危害の懸念が絶えない。プリオン病は致死性の神経変性疾患で治療法がないため、C-BSE 再興の防止、並びに非定型 BSE を含め動物プリオン病のヒトへの感染リスクの低減を目的とした管理措置は重要である。最近、非定型スクレイピーが C-BSE の起源となることが報告された。平成 29-31 年度に実施した厚労科研事業では、CWD 病原体が C-BSE 様の病原体に変化することを見出した。従って、C-BSE 病原体に限らず、動物プリオン病の病原体の性状が変化してヒトへ感染することを想定した対策が必要となる。各種動物プリオン病のヒトへのリスク、および、ヒトに感染性を有する病原体に変化する可能性に関する知見

は、適切な管理措置の根拠となる。必要となる科学的知見の収集・蓄積には、各種動物プリオン病の高精度検出・性状解析法の整備と感染動物における病態解析が必要である。そこで本研究では、1) 各種動物プリオン病の高精度検出系の整備、2) 非定型 BSE 感染ウシおよびサル病態解析、3) プリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴う株の出現、に関する研究を進め、その成果をもって非定型 BSE を含め、動物プリオン病の病原体がヒトへ感染するリスクの低減に貢献する。

## B. 研究方法

1) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

1-1) Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) を阻害する脂質の除去法の検討

PrP<sup>Sc</sup> のシードとして基質としてプリオン 22L 株、Obihiro 株、Chandler 株を使用した。定型 (C-)、および非定型 (H-, L-) BSE、定型スクレイピー、および CWD を使用した。基質として、組換えマウス (Mo) PrP (rMoPrP)、組換えシカ (Cer) PrP (rCerPrP)、および rMoPrP と rCerPrP のキメラ PrP である rCerPrP-173S<sub>Mo</sub>/177N<sub>Mo</sub> を用いた。

総リン脂質 (TPL)、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS) を使用した。ヒトの脳の脂質組成を参考に、0.0008%~0.0012%の濃度で使用した。

PBS にグリセロリン脂質を加えた疑似試料、および 2%各種動物脳乳剤は、20 倍量の Bu/Me (3:1) を加え混和した後、20,000 x g, 10 分の遠心によりタンパク質画分を沈殿させた。沈殿物は元の脳乳剤と等量の PBS に懸濁して、RT-QuIC 用試料とした。反芻動物の脳乳剤は、20~40 倍量の Bu/Me (3:1) と混和して、同様の操作により、脂質を除去した RT-QuIC 用試料とした。

1-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

令和 3 年度に作出した、カニクイザル Prnp を安定的に発現するヒト神経芽細胞 IMR32 細胞はサル馴化 C-BSE プリオンが安定的に増殖するが、この細胞から、CRISPR/Cas9 法によりヒト PRNP 遺伝子を欠失させた。

## 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

### 2-1) L-BSE プリオン経口感染ウシの末梢組織における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積評価

L-BSE 感染ウシ脳乳剤 (50g) を経口投与 153 ヶ月を経たウシ (#9383) の中枢神経系、末梢神経系および回腸パイエル板における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を超高感度プリオン検出法である PMCA を用いて評価する。

### 2-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

#### < L-BSE 経口接種カニクイザル体液からの PrP<sup>Sc</sup> の検出 >

サル L-BSE プリオンの検出には、RT-QuIC 法を用いた。RT-QuIC の基質にはヒト組換え PrP を使用した。シードとして解剖直前の L-BSE 経口接種カニクイザルの脳脊髄液 (CSF) および尿、血漿を用いた。実験には、経口接種サル 2 頭の他、発症およびプリオンの蓄積が確認されている L-BSE 脳内接種サル 1 頭からの体液を使用した。

#### < L-BSE および H-BSE 脳内および経口接種カニクイザルの解析 >

H-BSE 感染ウシの 10%脳乳剤 (0.2 mL : 20 g 脳重量相当) をカニクイザル 2 頭 (#24 [2020 年 8 月 17 日安楽死 (1757 日目 : 4 年 10 か月)、 #25 [2021 年 2 月 19 日安楽死 (1942 日目 : 5 年 4 か月)]) に脳内接種、また 20%脳乳剤 (5.0 mL x 8 回 : 8 mg 脳重量相当) をカニクイザル 2 頭 (#26、#27 [2020 年 8 月 18 日安楽死 (1758 日目 : 4 年 10 か月)]) に経口投与を実施し、継続的に観察した。経口投与を行った #26 は 2021 年 11 月 15 日 (2212 日目 : 6 年 1 か月) に安楽死、解剖を行った。脳、脊髄、脊髄神経根、末梢神経、リンパ節、眼球、鼻腔粘膜、骨髄、全身臓器を採取し、凍結およびホルマリン浸漬材料として保管した。経口的または脳内に H-BSE 由来プリオンを接種されたサルの中枢神経系を病理組織学的および生化学的に詳細に解析した。

L-BSE をカニクイザル脳内接種し 3 継代目の

脳の 20%乳剤を 2 頭 (#30、#31) に 2021 年 1 月 27 日から 2021 年 3 月 17 日に経口投与を行った。また、L-BSE (BSE JP/24 佐世保 : L-BSE) をカニクイザル脳内接種し 1 継代目の #15 の 10%脳乳剤をカニクイザル 2 頭 (#34、#35) に 2021 年 11 月 16 日に脳内接種を行った。

脳脊髄液からのタウ蛋白の検出は以下の通り行った。脳脊髄液は、清浄区域での解析を行うために、10%SDS, 0.2M DDT, 8M Urea を含むサンプルバッファーとして 98°C 10 分間加熱処理後の検体を用いてウエスタンブロッティングを行った。一次抗体は、リン酸化タウ検出には、抗ヒト PHF-Tau モノクローナル抗体 AT270 を用いた。

### 3) CWD および非定型スクレイピーのヒトへの感染リスクの推定、およびプリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴うプリオン株の出現

#### 3-1) TgHu129MM マウスを用いた動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

国内で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例)、または、米国由来の CWD 感染オジロジカ脳乳剤 (2 症例) およびエルク症例 (4 症例) の 5 または 10%脳乳剤 (20 μL) を TgHu129M マウスの脳に接種し、最長 800 日間観察した。脳および脾臓等のリンパ組織を採取し、ウエスタンブロット (WB) 法と免疫組織化学染色 (IHC) により PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を調べた。ヒツジおよびヤギからウシへの異種間伝達による C-BSE プリオンの出現を検証するため、C-BSE を効率的に増幅する条件下で Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) を実施し、非定型スクレイピー発症脳乳剤を接種した TgBoPrP マウスの脳内に C-BSE 様プリオンが存在するかを検証した。

#### 3-2) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤あるいは CWD 感染シカ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

非定型スクレイピー感染ヒツジ 2 個体からの脳乳剤をシードとして TgBov の脳乳剤を基質とした PMCA を行った。PMCA 後の反応液の 1/10

量を新しい反応液に加え、再度 PMCA を行った。この操作を少なくとも 11 回繰り返し (連続 PMCA)、PrP<sup>Sc</sup> 様プロテアーゼ K 抵抗性 PrP (PrPres) の増幅の有無を調べた。生成した PrPres について生化学的性状解析を行った。

4 個体分の 10% CWD 感染脳乳剤を 135°C、30 分間オートクレーブ (AC) 処理し、CWD プリオンの不活化を行った。その後、AC 処理した CWD 感染脳乳剤をシードとしてシカ PrP 発現ノックインマウス (CerKi) 脳乳剤および TgBov 脳乳剤を基質とした連続 PMCA を行い、生成した PrPres について生化学的性状解析を行った。

#### (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。具体的な内容は各分担報告書に記載した。

### C. 研究結果

#### 1) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

##### 1-1) RT-QuIC を阻害する脂質の除去法の検討

グリセロリン脂質 (PC、PE、PC) 単独では、マウス 22L プリオンの RT-QuIC は  $10^{-1}$  程度阻害されたが、これらを混合すると、RT-QuIC は完全に阻害された。0.0028% の TPL の存在、あるいは 2% 非感染マウス脳乳剤の存在により、マウス 22L プリオンの RT-QuIC による検出は完全に阻害されたが、Bu/Me の前処理による脂質除去により、検出感度が  $10^3$  程度改善された。

0.0028% の TPL の存在により、H-, L-BSE 検出用の RT-QuIC による検出は完全に阻害されるが、Bu/Me の前処理による脂質除去により、RT-QuIC の検出感度が陰性対照の  $10^{-1}$  までに改善された。RT-QuIC による定型スクレイパーの検出には、rCerPrP-173S<sub>M0</sub>/177N<sub>M0</sub> が安定した結果を示すが、この反応は 0.0028% の TPL により完全に阻害された。Bu/Me の前処理による脂質除去により、RT-QuIC の検出感度が陰性対照と同定度以上に

改善された。

以上のように、Bu/Me によるワンステップ脂質除去は RT-QuIC の試料前処理に有効であったが、C-BSE 検出用の RT-QuIC は依然として改良が必要である。

##### 1-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

カニクイザル馴化 BSE プリオンが持続感染できる培養細胞はこれまで知られていなかったが、R3 年度までにカニクイザル Prnp を導入したヒト神経芽細胞腫 IMR32 由来の一細胞が有望であることを見出した。この細胞を新たな研究リソースとして確立するために、内在的に発現するヒト PrP<sup>C</sup> によるプリオン増殖の干渉を排除するために、本年度はゲノム編集により内在性のヒト PRNP を欠失させたノックアウト細胞を作成した。ゲノム編集は、Cas9/sgRNA をコードする plasmid (pGuide-it, Clontech) による方法でヒト PRNP ノックアウト細胞を得た。ノックアウト細胞にカニクイザル Prnp を導入した細胞は、サル馴化 C-BSE プリオンが持続感染することを確認した。

##### 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

##### 2-1) L-BSE プリオン経口感染ウシの末梢組織における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積評価

令和 3 年度に報告したとおり、WB 法では当該ウシ (#9383) の中枢神経系からは PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。そこで、本年度は超高感度プリオン検出法である PMCA を用いて中枢神経系およびプリオン経口伝達への関与が考えられる末梢組織での PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を調べたが、延髄門部、脊髄頸膨大および脊髄腰膨大からは PrP<sup>Sc</sup> は検出できなかった。また、頸部迷走神経、星状神経節、前腸間膜神経節、腰部交感神経幹および回腸パイエル板からも PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった

##### 2-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

L-BSE 経口接種カニクイザルでの感染成立の

有無を最終確認するために、体液から RT-QuIC を用いて PrP<sup>Sc</sup> の検出を行った。脳内接種サル 1 頭および経口接種サル 2 頭の CSF、尿、血漿調べたところ、脳内接種サルおよび経口接種サルの CSF および尿から陽性シグナルが得られたことから、L-BSE 経口ルートでカニクイザルに感染が成立することが判明した。

これまでに、H-BSE を脳内接種 (2 頭) および経口投与 (2 頭) したカニクイザルは、経過観察中、自傷行為が頻繁に観察された個体があったが、持続的な神経症状は認められなかった。また、接種後、4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死を行い WB および IHC により詳細に PrP<sup>Sc</sup> の存在を調べたが、調べた中枢神経系、末梢神経系組織、およびリンパ系組織で全て陰性であった。

プリオン病感染初期病態の解析を行うことを目的として、L-BSE をカニクイザルに脳内接種し、発症前の 398 日目に安楽死し解剖を実施した。MRI では軽度に脳室が拡張し、病理組織検索では病変は発症後に安楽死し解剖を行った 2 頭に比べ、軽度ではあるものの、腰髄まで感染性プリオンの沈着と空胞変性が認められた。脳脊髄液のタウ蛋白の解析では、タウ蛋白および、AT270 リン酸化タウ蛋白が検出された。

3) CWD および非定型スクレイピーのヒトへの感染リスクの推定、およびプリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴う株の出現

3-1) TgHu129MM マウスを用いた動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

我が国で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例)、または米国由来の CWD 感染オジロジカ脳乳剤 (2 症例) とエルク脳乳剤 (4 症例) を TgHu129MM マウスに脳内接種し、最長 800 日間観察したが、神経症状を呈するマウスは観察されなかった。また、IHC 法および WB 法を用いて PrP<sup>Sc</sup> の検出を試みたが、脳組織から PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。

我が国で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例) を TgBoPrP マウスに脳内接種し、最長 800 日間観

察したが、WB 法では PrP<sup>Sc</sup> を検出できなかった。極微量の C-BSE 様プリオンが非定型スクレイピー発症脳乳剤を接種した TgBoPrP マウスの脳内に存在する可能性を調べるため、C-BSE プリオンを効率的に増幅する PMCA を実施したが、PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。

3-2) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤あるいは CWD 感染シカ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

非定型スクレイピー感染脳乳剤をシードとして TgBov 脳乳剤を基質に用いた PMCA を行った。アルギニンエチルエステル (AEE) 非存在下では、PrP<sup>Sc</sup> は増幅しなかったが、AEE 存在下では PrP<sup>Sc</sup> の増幅が認められた。WB および PK 感受性試験から増幅した PrP<sup>Sc</sup> は、H-BSE の PrP<sup>Sc</sup> と非常によく似ていた。

135°C、30 分間の AC 処理により、CWD 感染脳乳剤に含まれる PrP<sup>Sc</sup> 量は WB の検出限界以下となる。AC 処理 CWD 感染脳乳剤をシードとして CerKi マウスの脳乳剤を基質として連続 PMCA を行ったところ、増幅した PrP<sup>Sc</sup> のバンドパターンは AC 未処理 CWD 感染脳乳剤シード由来の PrP<sup>Sc</sup> とは異なっていた。AC 処理 CWD 感染脳乳剤をシードとして TgBoPrP 脳乳剤を用いて PMCA を行ったところ、C-BSE 様 PrP<sup>Sc</sup> の増幅を認めた。

## D. 考察

1) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

グリセロリン脂質は単体では強い RT-QuIC 阻害効果を示さなかったが、混合すると強い阻害効果を示したことから、RT-QuIC の実用性を高めるために簡易な脂質の除去法が必要となった。そこで、Löfgren ら (2012) が報告した Bu/Me によるワンステップ脂質抽出法の有用性を検討した。総脂質 (TPLs) を添加した疑似サンプルは、マウス、非定型 BSE、定型スクレイピー検出用の RT-QuIC を阻害したが、Bu/Me による脂質抽出により RT-QuIC が阻害されなくなることから、Bu/Me によるワンステップ脂質抽出法は RT-

QuIC 用試料の前処理法として有用であることが示唆された。ただし、動物種によって Bu/Me 混合液と脳乳剤の混合割合を変える必要があり、さらなる条件の精査は必要である。

RT-QuIC による C-BSE の検出は実用レベルまの高感度化が達成できていない。今回用いた Bu/Me によるワンステップ脂質除去法は C-BSE 検出用の RT-QuIC の試料前処理法としても活用できることが示唆されたことから、今後、C-BSE 検出に最適な基質 (rPrP) および反応条件の最適化を進めることで、実用レベルの C-BSE 検出用 RT-QuIC の構築が期待される。

研究班が所有するウシ由来 BSE プリオンやカニクイザル馴化 BSE プリオンが持続的に感染する培養細胞の開発を進めた。細胞株のスクリーニング (R3 年度に実施) を経て、カニクイザル馴化 BSE プリオンが持続感染する IMR32 ヒト神経芽細胞種由来の細胞を作出した。この細胞の本来の特性として、外来プラスミドのリポフェクション効率やや低いという問題点があるが、BSE プリオンの感受性の解析、特に、ヒト PRNP のさまざまな多型の違いと BSE プリオンの感染リスクの相関などを解析する *ex vivo* 実験系として活用できることが期待される。

## 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

50 グラムの L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与 153 ヶ月後に解剖したウシ (#9383) では、PMCA を用いても PrP<sup>Sc</sup> が検出されなかったことから、感染は成立していなかった。一方、50 グラムの L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与後 88 ヶ月で斃死した #6781 は脳内に PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を確認していることから (令和 2 年度)、ウシ間における L-BSE の経口伝播効率は極めて低いと思われる。ただし、感染が成立していた 1 頭の回腸パイエル板からは PMCA 法により PrP<sup>Sc</sup> が検出されたことから (R2 年度の成果)、L-BSE 対策としても特定危険部位 (SRM) の除去は必要であると考えられた。

脳内接種サル 1 頭および経口接種サル 2 頭からの CSF、尿、血漿を前処理なしに直接反応液

に加え、RT-QuIC を行った。その結果、脳内接種サルおよび経口接種サルの CSF および尿から PrP<sup>Sc</sup> が検出されたことから、L-BSE プリオンが経口ルートでカニクイザルに感染する可能性が示唆された。

H-BSE プリオンの脳内接種を行った 2 頭および経口接種を行った 2 頭について接種後 4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死し、WB および IHC で PrP<sup>Sc</sup> の検出を行ったが、全て陰性であったことから、H-BSE プリオンのヒトへの伝達リスクは、C-BSE プリオンや L-BSE プリオンと比べ、低いことが示唆された。

## 3) CWD および非定型スクレイピーのヒトへの感染リスクの推定、およびプリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴う株の出現

### 3-1) TgHu129MM マウスを用いた動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

非定型スクレイピープリオンおよび CWD プリオンのヒトへの伝達リスクについて、TgHu129MM マウスモデルを用いて推定した。我が国で摘発されたヒツジおよびヤギ由来の 2 株の非定型スクレイピー株を接種し、最長 800 日間の観察を実施したが、PrP<sup>Sc</sup> を蓄積する個体は認められなかった。米国由来の CWD6 症例を接種した TgHu129MM マウスについても同様であったことから、非定型スクレイピープリオンおよび CWD プリオンのヒトへの伝播には、非常に強い種の壁が存在することが示唆された。

非定型スクレイピープリオンのウシへの伝達リスクの推定と同時に、ヒツジおよびヤギからウシへの異種間伝達による従来型 BSE (C-BSE) プリオンの出現の可能性についても検証したが、Huor ら (2019) が報告したような、非定型スクレイピープリオンの異種間伝達による C-BSE プリオンの出現は再現できなかった。

### 3-2) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤あるいは CWD 感染シカ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

非定型スクレイピープリオンから異種間伝播

により C-BSE プリオンが出現することが報告されているが (Huor et al., 2019)、本研究では、非定型スクレイピーには、H-BSE 様プリオンが含まれていると解釈できる結果を得た。非定型スクレイピーがウシへ伝達した場合、H-BSE 様プリオンを生じる可能性も考えられる。

135°CAC 処理した CWD 感染脳乳剤から PMCA により C-BSE 様 PrP<sup>Sc</sup> が増幅したことから、CWD 感染シカ脳内には、C-BSE 様プリオンも微量存在する可能性は否定できない。

## E. 結論

- 1) Bu/Me によるワンステップ脂質除去法が RT-QuIC の試料前処理法として有用であることを示した。プリオンの由来となる動物種および RT-QuIC の基質となる組換え PrP の組み合わせ、および RT-QuIC の最適化は必要であるが、本法を用いることで実用レベルの、非定型 BSE、定型スクレイピー、および CWD 検出用の RT-QuIC が構築できた。
- 2) ウシ間における L-BSE プリオンの経口伝播の効率は極めて低いが経口ルートで感染が成立すると結論付けた。高齢牛で自然発生すると考えらる L-BSE がヒトに経口感染する可能性が示唆されたことから、L-BSE の感染源がフードチェーンに入ることのないよう、現状の BSE 対策は維持する必要がある。
- 3) これまで、H-BSE プリオンの脳内接種を行った 2 頭および経口接種を行った 2 頭について接種後 4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死し、解析を進めてきたが、伝達を示す証拠は得られなかったことから、霊長類を用いた感染実験でも、H-BSE プリオンの

ヒトへの伝達リスクは、C-BSE プリオンや L-BSE プリオンと比べ、低いと結論付けた。

- 4) サル馴化 C-BSE プリオンが持続感染する IMR32 ヒト神経芽細胞種由来の培養細胞を作出した。
- 5) 体液の RT-QuIC で陽性シグナルが得られたことから、L-BSE は経口接種により、サルに感染が成立した可能性が示唆された。
- 6) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤に、H-BSE 様プリオンが含まれている可能性、また、CWD 感染シカ脳乳剤に C-BSE 様プリオンがごく微量存在する可能性が示唆された。
- 7) ヒトプリオンタンパク質遺伝子過発現マウス (TgHu129MM) を用いた感染実験から、非定型スクレイピープリオンおよび北米由来の CWD プリオンのヒトへの伝播リスクは極めて低いことが示唆された。
- 8) Huor ら (2019) が報告した非定型スクレイピープリオンのウシへの異種間伝達による C-BSE プリオンの出現は再現できなかった。

## 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  
各研究分担者の報告書を参照
2. 実用新案登録  
該当なし

## II. 分 担 研 究 報 告 書

# 1. RT-QuIC 法の阻害物質の除去法の検討

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究院・教授

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学・大学院獣医学研究院)

## 研究要旨

Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) 反応は、アミロイド seeding 活性の検出により、簡便かつ高感度に異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の存在を検出可能な方法である。その簡便性から、ヒトおよび動物のプリオン病の診断補助、動物プリオン病のモニタリング等に使用されている。しかし、RT-QuIC 反応は阻害物質による影響を受けやすく、反応液中に含まれる組織乳剤の濃度が高いと反応は阻害される。これまでに非定型 BSE、定型スクレイピー、およびシカ科動物の慢性消耗病 (CWD) の診断およびモニタリングに使用可能な RT-QuIC 法はほぼ構築できたが、さらに実用的な方法への改良は必要である。一方、非定型スクレイピーと C-BSE の診断およびモニタリングに使用可能な高感度 RT-QuIC 法は実用レベルには達していない。阻害物質による影響を排除できるならば、RT-QuIC 法の有用性がさらに高まる。昨年までに、リン脂質の sphingomyelin (SM) に強い RT-QuIC 阻害効果を見だし、酵素処理による除去法を検討したが、実用的な方法を構築するには至らなかった。一方、グリセロリン脂質の phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)、それぞれ単独では、RT-QuIC は阻害しないが、その混合物で RT-QuIC を阻害することから、やはり、スフィンゴ脂質とグリセロリン脂質を簡便に除去する方法が必要である。そこで、ワンステップ脂質除去法としてブタノール/メタノールを用いた脂質抽出法を RT-QuIC の前処理に応用した。対象となる動物種により、脳乳剤からの脂質抽出に使用するブタノール/メタノールと脳乳剤の比率を変更する必要があるが、マウスプリオン (22L, Obihiro, Chandler 株)、L-および H-非定型 BSE、定型スクレイピー、CWD の RT-QuIC は、検出感度が  $10^{-8}$  レベルで安定し、ほぼ実用的なレベルの操作性と検出感度を達成することができた。一方で、C-BSE と非定型スクレイピーの検出感度の改善には至らず、基質の選択を含めてさらなる改良が必要である。

## A. 研究目的

これまで、ヒツジのスクレイピーが直接ヒトに感染して問題となったことはないが、ヒツジのスクレイピーは、病原体 “プリオン” に多様性があり、ヒトに感染しうるプリオン株の存在は否定できない。BSE の発生は飼料規制等の管理措置の徹底により制御下にあるが、スクレイピーは発生している。我が国ではヒツジの飼養頭数が少ないことから、スクレイピーの発生は家畜衛生上大きな問題とならないが、ヒツジおよびヤギの非定型スクレイピーの発生を含めて発生報告がある<sup>1,2)</sup>。最近、非定型スクレイピーが C-BSE の起源となる

ことが報告された<sup>3)</sup>。また、昨年度の本研究班の研究で、分担研究者の新らは、慢性消耗病 (CWD) プリオンが試験管内増幅反応により C-BSE 様プリオンが出現することを報告している。

従って、BSE のみならず、各種動物プリオン病の発生状況の調査、および各種動物プリオンの高感度・高精度検出法の整備は、動物プリオン病の迅速な診断と病原体の同定に必要である。

RT-QuIC 法は簡便かつ迅速高感度な PrP<sup>Sc</sup> 検出法としてヒトおよび動物のプリオン病の診断補助、動物プリオン病のモニタリング等に使用されている。しかし、RT-QuIC 反応は阻害物質による

影響を受けやすく、反応液中に含まれる組織乳剤の濃度が高いと反応は阻害される。この点が改善できれば、RT-QuIC法の汎用性は高まり、ウェスタンブロット法や免疫組織化学に替わる方法として、モニタリング実施機関の一元化などにも対応可能となる。

昨年までに、リン脂質、グリセロリン脂質のRT-QuIC阻害活性を調べ、sphingomyelin (SM) に強力なRT-QuIC阻害活性があることを見だし、その特異的除去法を検討したが、改良には至らなかった。一方、グリセロリン脂質のphosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)、それぞれ単体では、顕著なRT-QuIC阻害活性は認められなかったが、これらの混合物はRT-QuICを顕著に阻害した。そのため、リン脂質、グリセロリン脂質の一括除去がRT-QuICの汎用性向上に必要であることから、ブタノール/メタノール (Bu/Me) を用いた生体試料からの脂質抽出法 (Löfgren et al., 2012)<sup>5)</sup> をRT-QuICの被検材料としての脳乳剤の前処理法としての有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1) プリオン感染試料

スクレイパーマウス順化株としてプリオン 22L株、Obihiro株、Chandler株を使用した。BSE材料として、定型 (C-), および非定型 (H-, L-) BSEを使用した。定型スクレイパーおよびCWDも使用した。

### 2) RT-QuIC法

基質として、マウスプリオンの検出には組換えマウス (Mo) PrP (rMoPrP)を使用した。H-, L-BSEおよびCWDの検出には組換えシカ (Cer) PrP (rCerPrP)を使用した。定型スクレイパーの検出には、rMoPrPとrCerPrPのキメラPrPであるrCerPrP-173S<sub>Mo</sub>/177N<sub>Mo</sub>を用いた。これら以外には、組換えバンクボール (Bo)、ハムスター (Ha)、ウシ (Bo) PrPを用いた。反応液は25 mM PIPES, 10 mM Naphosphate, 500 mM NaCl, 100 μM EDTA, 10 μM チオフラビン (ThT) を基本とした。また攪拌スピードは432 rpmとした。基質プレートリダとしてTECAN F200を用いた。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。

### 3) グリセロリン脂質

総リン脂質 (TPL)、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS) を使用した。ヒトの脳の脂質組成を参考に、0.0008%~0.0012%の濃度で使用した。

### 4) 脳乳剤のブタノール/メタノール (Bu/Me) 処理

PBSにグリセロリン脂質を加えた疑似試料、および2%各種動物脳乳剤は、20倍量のBu/Me (3:1)を加え混和した後、20,000 x g, 10分の遠心によりタンパク質画分を沈殿させた。沈殿物は元の脳乳剤と等量のPBSに懸濁して、RT-QuIC用試料とした。反芻動物の脳乳剤は、20~40倍量のBu/Me (3:1)と混和して、同様の操作により、脂質を除去したRT-QuIC用試料とした。

### (倫理面への配慮)

動物を使用する実験計画は、北海道大学動物実験委員会で承認されたプロトコールに従って実施した(承認番号18-0110)。

## C. 研究結果

1) グリセロリン脂質を加えた疑似試料に対するBu/Me抽出の効果 (マウスプリオンの検出: 図1)

PC (0.0008%), PE (0.0012%), PC (0.0012%) 単独では、マウス22LプリオンのRT-QuICは10<sup>-1</sup>程度阻害されたが、これらを混合すると、RT-QuICは完全に阻害された。0.0028%のTPLの存在、あるいは2%非感染マウス脳乳剤の存在により、マウス22LプリオンのRT-QuICによる検出は完全に阻害されたが、Bu/Meの前処理による脂質除去により、RT-QuICのlag phaseは長くなる傾向は認められるものの、検出感度が10<sup>3</sup>程度改善された。

2) 総リン脂質を加えた疑似試料に対するBu/Me抽出の効果 (C-, H, L-BSEの検出: 図2)

0.0028%のTPLの存在により、H-, L-BSE検出用のRT-QuICによる検出は完全に阻害されるが、Bu/Meの前処理による脂質除去により、RT-QuICの検出感度が陰性対照の10<sup>-1</sup>までに改善された。ただし、rCerPrPを基質として使用する場合、2%非感染ウシ脳乳剤存在下でH-, L-BSE検出用のRT-QuICは阻害されないことから、rCerPrPを基質

として使用する場合、H-, L-BSE 検出用 RT-QuIC の脂質による阻害効果は考慮しなくて良いと考えられるが、個体によっては影響を受ける可能性があることが予想される。2%被感染ウシ脳乳剤存在下を Bu/Me の前処理により脂質除去を行った場合、H-, L-検出用の RT-QuIC の検出感度の低下は最大  $10^{-1}$  であったことから、RT-QuIC による H-, L-BSE の検出にも Bu/Me 抽出は有効と思われる。

C-BSE の RT-QuIC による検出感度は rCerPrP を用いた場合でも低い、その反応は 0.0028% の TPL あるいは 2%被感染ウシ脳乳剤存在下で阻害される。この試料を 40 倍量の Bu/Me で前処理して脂質除去を行った場合、反応の安定性を確認する必要があるが、C-BSE が RT-QuIC で検出されるようになった。

3) 総リン脂質を加えた疑似試料に対する Bu/Me 抽出の効果 (定型スクレイピー：図 3) の (図 3)

RT-QuIC による定型スクレイピーの検出には、rCerPrP-173SM<sub>0</sub>/177NM<sub>0</sub> が安定した結果を示すが、この反応は 0.0028% の TPL により完全に阻害される。Bu/Me の前処理による脂質除去により、RT-QuIC の検出感度が陰性対照と同定度以上に改善された。rCerPrP-173SM<sub>0</sub>/177NM<sub>0</sub> を基質として用いる場合、2%非感染ヒツジ脳乳剤の存在下でも RT-QuIC は阻害されないが、個体により個体によっては影響を受ける可能性があることが予想されることから、Bu/Me 抽出の影響を確認したところ、20 倍量の Bu/Me では結果が安定しなかったため、40 倍量の Bu/Me で抽出したところ、lag phase は長くなるものの、陰性対照と同等の検出感度が得られたことから、定型スクレイピー検出用の RT-QuIC でも Bu/Me の抽出は有用と思われる。

#### D. 考察

RT-QuIC を阻害する脂質の特定を行い、SM が強い阻害作用を示したが、グリセロリン脂質は単体では強い阻害効果を示さなかったが混合すると強い阻害効果を示したことから、実用的な脂質の除去が RT-QuIC の実用性を高めるために必要となった。そこで、Löfgren ら (2012)<sup>5)</sup> が報告した Bu/Me による簡易脂質抽出法の、RT-QuIC 用試料の前処理への有用性を検討した。総脂質 (TPLs) を添加した疑似サンプルは、マウス、非定型 BSE、

定型スクレイピー検出用の RT-QuIC を阻害したが、Bu/Me による脂質抽出により RT-QuIC が阻害されなくなることから、Bu/Me による一段階脂質抽出法は RT-QuIC 用試料の前処理法として有用であることが示唆された。ただし、動物種によって Bu/Me 混合液と脳乳剤の混合割合を変える必要があり、ウシ、ヒツジではその比率を 40:1 とすることで結果が比較的安定した。しかし、個体差を考慮する必要もあり、今後、さらに条件の最適化が必要である。本法は CWD 検出用の RT-QuIC の試料前処理法としても有用であった (結果は示さず)。

一方、RT-QuIC による C-BSE の検出は実用レベルまでの高感度化が達成できていない。実用的な感度は得られていないもの、今回用いた Bu/Me による脂質除去法は C-BSE 検出用の RT-QuIC の試料前処理法としても活用できることが示唆されたことから、今後、C-BSE 検出に最適な基質 (rPrP) および反応条件の最適化を進めることで、実用レベルの C-BSE 検出用 RT-QuIC が構築できると思われる。

#### E. 結論

中枢神経系組織乳剤中の脂質による RT-QuIC 阻害効果は、脂質毎に異なるが、実用的な RT-QuIC の構築を目指す場合、一段階で効率良く脂質を除去する方法が必要である。Bu/Me によるワンステップ脂質除去法が RT-QuIC の試料前処理法として有用であることを示した。プリオンの由来となる動物種および RT-QuIC の基質となる組換え PrP の組み合わせおよび RT-QuIC の最適化は必要であるが、Bu/Me ワンステップ脂質除去法は、非定型 BSE、定型スクレイピー、および CWD 検出用の RT-QuIC に応用可能であることが明らかとなった。

#### <引用論文>

1. Imamura M, Miyazawa K, Iwamaru Y, Matsuura Y, Yokoyama T, Okada H. Identification of the first case of atypical scrapie in Japan. *J Vet Med Sci*, 2017 78(12): 1915-1919. doi: 10.1292/jvms.16-0379.
2. Matsuura Y, Miyazawa K, Imamura M, Yokoyama T, Iwamaru Y. First case of atypical scrapie in a goat in Japan. *J Vet Med Sci*, 2019 81(7): 986-989. doi: 10.1292/jvms.18-0710.

3. Huor A, Espinosa JC, Vidal E, Cassard H, Douet JY, Lugan S, Aron N, Marín-Moreno A, Lorenzo P, Aguilar-Calvo P, Badiola J, Bolea R, Pumarola M, Benestad SL, Orge L, Thackray AM, Bujdoso R, Torres JM, Andreoletti O. The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019 116(52): 26853-26862. doi: 10.1073/pnas.1915737116.
4. Hoover CE, Davenport KA, Henderson DM, Zabel MD, Hoover EA. Endogenous Brain Lipids Inhibit Prion Amyloid Formation In Vitro. *J Virol*, 2017 91(9): e02162-16. doi: 10.1128/JVI.02162-16.
5. Löfgren L, Ståhlman M, Forsberg GB, Saarinen S, Nilsson R, Hansson GI. The BUME method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *J Lipid Res*. 2012 53(8):1690-700. doi: 10.1194/jlr.D023036
- PrPSc in prion-infected primary neuronal cells. Asian Pacific Prion Symposium 2022, Fujisawa, Japan, Dec. 14-15, 2022.
- 2) Hoshika T, Komatsu Y, Erdenebat T, Suzuki A, Sato T, Horiuchi M. Brain region-dependent distinct neuronal cell deaths in prion-infected mice. Asian Pacific Prion Symposium 2022, Fujisawa, Japan, Dec. 14-15, 2022.
- 3) Horiuchi M, Takashi Hoshika T, Erdenebat T, Tanaka M, Suzuki A, Komatsu Y, Toyotaka Sato T. Mechanism of neuronal cell death in prion-infected mice. Asian Pacific Prion Symposium 2022, Fujisawa, Japan, Dec. 14-15, 2022.
- 4) Erdenebat T, Suzuki A, Komatsu Y, Sato T, Horiuchi M. Analysis of mechanism for brain-region specific prion propagation in mice infected with prions, Sapporo Summer Symposium for One Health, Sept 14-15, Sapporo

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsuura Y, Miyazawa K, Horiuchi M, Suzuki A, Yokoyama M, Imamura M, Ikeda K, Iwamaru Y. Extended application of the rapid post-mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease. *Microbiol Immunol*, 66(5): 212-215, 2022. doi: 10.1111/1348-0421.12968.

##### 2. 学会発表

- 1) Uwamori N, Suzuki A, Tanaka M, Komatsu Y, Horiuchi M. Fine characterization of localization of

- 5) 星加 恭、小松 勇介、鈴木 章夫、佐藤 豊隆、堀内 基広 プリオン感染マウスの中枢神経組織における部位特異的な異なる神経細胞死 第45日本分子生物学会、2022年11月 千葉

#### 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

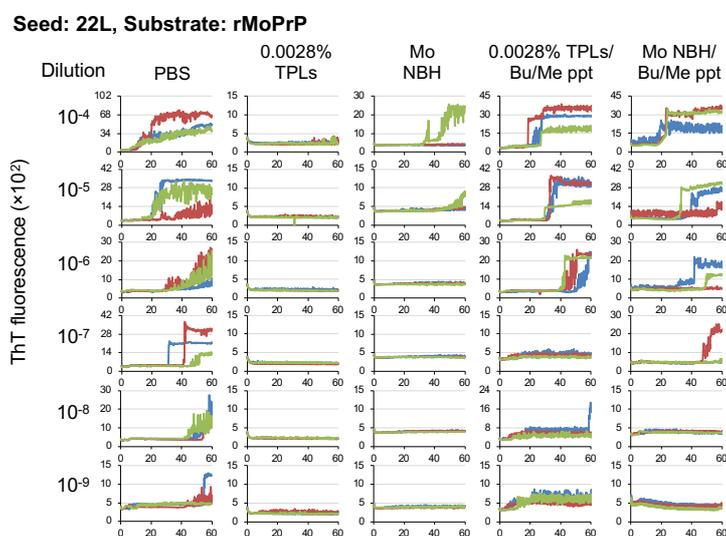
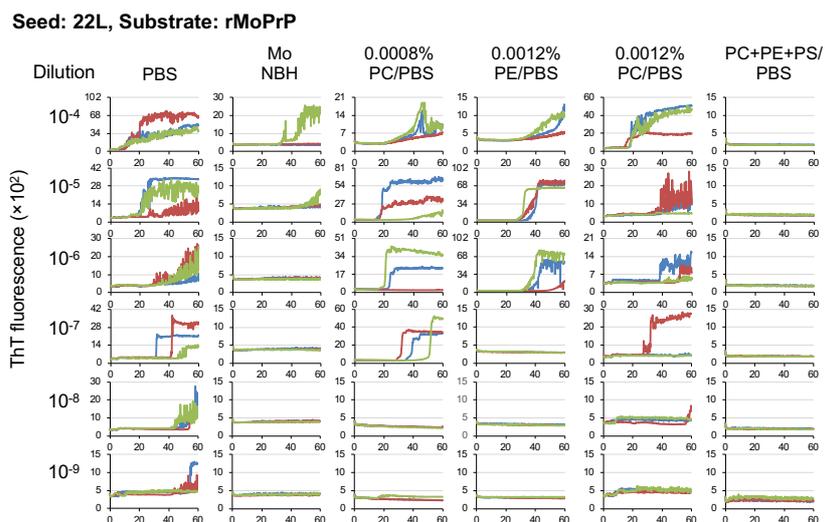


図 1. グリセロリン脂質による RT-QuIC 反応の阻害効果 (上段) および Bu/Me 抽出による阻害効果の改善 (下段)。

(上段) シードにマウスプリオン 22L 株感染脳乳剤、基質に rMoPrP を使用した。非感染マウス脳乳剤存在下 (Mo NBH) では非存在下 (PBS) と比較して RT-QuIC 反応は完全に阻害された。グリセロリン脂質の phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS) 存在下では、RT-QuIC は大きく阻害されないが、3 種の混合物は RT-QuIC を完全に阻害した (上段左)。

(下段) 総脂質 (TPLs) および非感染マウス脳乳剤存在下 (Mo NBH) はほぼ完全に RT-QuIC を完全に阻害したが、Bu/Me 抽出により (Bu/Me ppt)、RT-QuIC の反応が改善された。

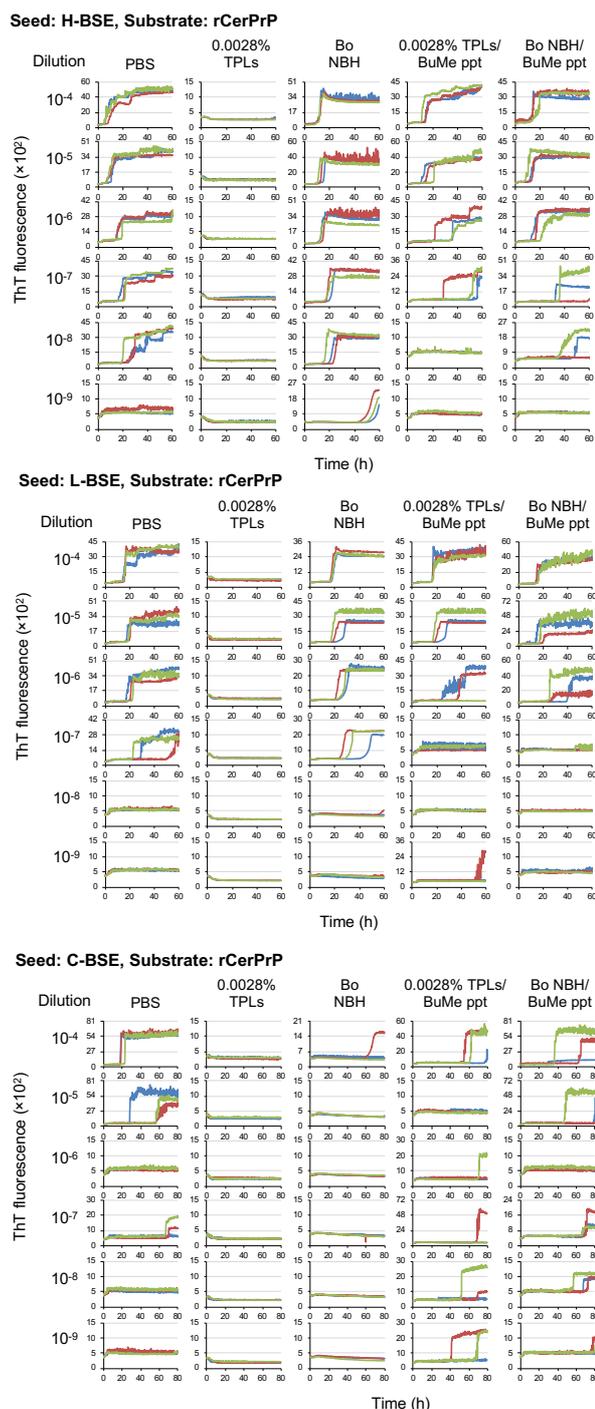


図2. 各種 BSE 検出用 RT-QuIC における Bu/Me 脂質抽出前処理法の効果

(上段) H-BSE の検出。総脂質 (TPLs) 存在下では反応が完全に阻害されるが、Bu/Me 処理により  $10^{-7}$  まで反応が回復した。非感染ウシ脳乳剤存在下 (Bo NBH) では反応は阻害されず、Bu/Me 処理による影響も軽微である (BuMe ppt)。

(中段) L-BSE の検出。総脂質 (TPLs) 存在下では反応が完全に阻害されるが、Bu/Me 処理により  $10^1$  まで反応が回復した。非感染ウシ脳乳剤存在下 (Bo NBH) では反応は阻害されず、Bu/Me 処理による影響も  $10^1$  程度であった (BuMe ppt)。

(下段) C-BSE の検出。C-BSE 検出用 RT-QuIC の検出限界は  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  と H-, L-BSE に比べ低い。この反応は、総脂質 (TPLs) 存在下、あるいは非感染ウシ脳乳剤存在下 (Bo NBH) ではほぼ完全に阻害されるが、Bu/Me 抽出により、反応が回復する傾向が認められる (BuMe ppt)。Bu/Me と脳乳剤の比は 40:1。

Seed: Scrapie, Substrate: rCerPrP-173S<sub>Mo</sub>/177N<sub>Mo</sub>

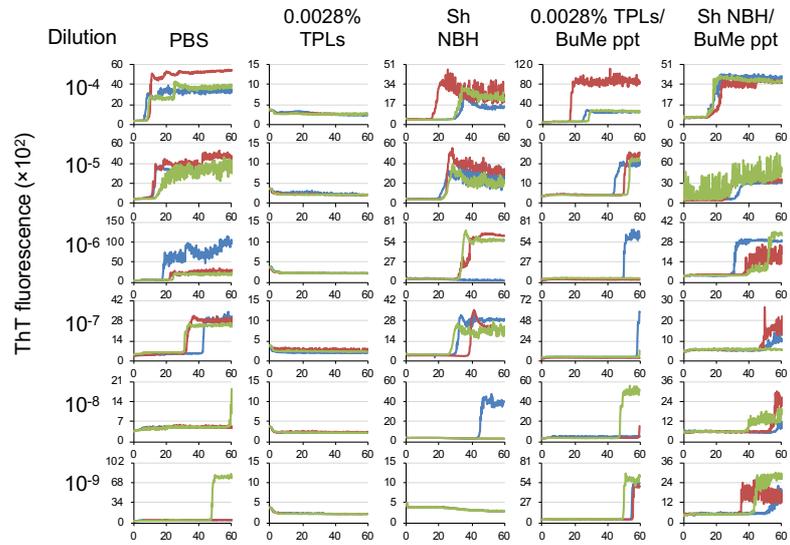


図3. 定型スクレイパー検出用 RT-QuIC における Bu/Me 脂質抽出前処理法の効果。定型スクレイパーとして Y5 株、基質として rCerPrP-173S<sub>Mo</sub>/177N<sub>Mo</sub> を使用。の検出。総脂質 (TPLs) 存在下では反応が完全に阻害されるが、Bu/Me 処理により 10<sup>-7</sup> まで反応が回復した (BuMe ppt)。非感染ヒツジ脳乳剤存在下 (Sh NBH) では反応は阻害されず、Bu/Me 処理による影響も軽微であった (BuMe ppt)。

## 2. 非定型 BSE 感染サルへのプリオン体内分布の解析 PMCA 法を用いた試験管内 C-BSE 出現の解析

分担研究者 新 竜一郎 宮崎大学医学部医学科感染症学講座微生物学分野 教授

研究協力者 今村 守一 宮崎大学医学部医学科感染症学講座微生物学分野 准教授

### 研究要旨

本年度は2つの課題の研究結果を報告する。1つ目の課題では、プリオン高感度検出法である RT-QuIC 法を用いて L-BSE プリオンを経口接種したカニクイザルの脳脊髄液および尿から陽性シグナルが得られるかを検討した。その結果、非常に微量ではあるが、経口接種サルの脳脊髄液および尿にプリオンが存在することが示唆された。このことは L-BSE プリオンの経口接種によりヒトに比較的近いカニクイザルでも感染が成立する可能性を示している。もう1つの課題では、これまでに我々は CWD シカ感染脳乳剤をシードとしてウシ正常型プリオン蛋白質(PrP)発現形質転換マウス (Bo<sup>Ts</sup>)脳乳剤を基質とした試験管内プリオン増幅法(PMCA)により、C-BSE 様プリオンが生じることを報告している。本年度は、C-BSE 様プリオンは PMCA により CWD プリオンが変化して生成したものではなく、実際に CWD 感染脳乳剤中に含まれているということを示す結果を得た。さらに、異種間 PMCA により非定型スクレイピー感染脳乳剤に H-BSE 様プリオンが含まれることを示唆する結果も得られた。

### A. 研究目的

経口ルートでの L-BSE のヒトへの感染リスクを推定するため、経口接種によりカニクイザルへの L-BSE プリオンの感染が成立するか否かをサル L-BSE プリオン高感度検出法により明らかにする。過去の未発表のデータから L-BSE 経口接種サルの経時的に採材された体液からプリオンが任意に検出されることが示されている。本年度は L-BSE 経口接種サルの解剖時体液からのプリオンの検出を試みた。

プリオンの異種間伝達により、新たなプリオン株や C-BSE 様プリオン株が出現する潜在的リスクを調べることを目的に、動物プリオンをシードとして異種間伝達、同種間伝達を模した試験管内増幅(PMCA)を行い、増幅産物の性状を解析する。これまでに我々は CWD シカ感染脳乳剤をシードとしてウシ正常型プリオン蛋白質(PrP)発現形質転換マウス (Bo<sup>Ts</sup>)脳乳剤を基質とした PMCA により、C-BSE 様プリオンが生じることを報告している。本年度は CWD シカ感染脳乳剤に含まれる C-BSE 様プリオンが CWD プリオンが変化して生じたものかを明らかにすることを目的に実験を行った。さらに、非定型スクレイピーがウシに伝達したことを模した異種間 PMCA を行った。

### B. 研究方法

1) L-BSE 経口接種カニクイザル体液からの異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の検出

サル L-BSE プリオンの検出には、プリオンのシード依存的フィブリル形成反応を利用したプリオン高感度検出法である RT-QuIC 法を用いた。RT-QuIC の基質にはヒト組換え PrP を使用した。シードとして解剖直前の L-BSE 経口接種カニクイザルの脳脊髄液(CSF)および尿、血漿を用いた。実験には、経口接種サル2頭の他、発症およびプリオンの蓄積が確認されている L-BSE 脳内接種サル1頭からの体液を使用した。

2) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

非定型スクレイピー感染ヒツジ2個体からの脳乳剤をシードとして Bo<sup>Ts</sup> 脳乳剤を基質とした PMCA を行った。PMCA 後の反応液の 1/10 量を新しい反応液に加え、再度 PMCA を行った。この操作を少なくとも 11 回繰り返し(連続 PMCA)、PrP<sup>Sc</sup> 様プロテアーゼ K 抵抗性 PrP (PrPres)の増幅の有無を調べた。生成した PrPres について生化学的性状解析を行った。

3) オートクレーブ処理 CWD 感染シカ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

4 個体分の 10% CWD 感染脳乳剤を 135°C、30 分間オートクレーブ(AC)処理し、CWD プリオンの不活化を行った。その後、AC 処理した CWD 感染脳乳剤をシードとしてシカ PrP 発現ノックインマウス(Cer<sup>Ki</sup>)脳乳剤および Bo<sup>Tg</sup>脳乳剤を基質とした連続 PMCA を行い、生成した PrPres について生化学的性状解析を行った。

(倫理面への配慮)

L-BSE 感染カニクイザル検体は、独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類研究センターより、共同研究として提供された。カニクイザルを用いた実験は、同霊長類研究センターの動物飼養管理規則と霊長類学会の「霊長類を用いた動物実験の指針」に基づいて行われた。L-BSE 感染実験は、独立行政法人医薬基盤研究所の動物福祉・動物管理・使用委員会および動物倫理バイオセーフティ委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

1) L-BSE 経口接種カニクイザル体液からの PrP<sup>Sc</sup> の検出

脳内接種サル 1 頭および経口接種サル 2 頭からの CSF、尿、血漿を前処理なしに直接反応液に加え、RT-QuIC を行った。その結果、脳内接種サルおよび経口接種サルの CSF および尿から陽性シグナルが得られた(図 1)。一方、血漿については、脳内接種サルを含め、陽性シグナルは得られなかった(データは省略する)。

2) 非定型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

非定型スクレイピー感染脳乳剤をシードとして Bo<sup>Tg</sup>脳乳剤を基質に用いた PMCA を行った。アルギニンエチルエステル(AEE)非存在下では、PrPres は増幅しなかったが、AEE 存在下では PrPres の増幅が認められた(図 2A)。ウェスタンブロットリング(WB)および PK 感受性試験から増幅した PrPres は、H-BSE シード PrPres と非常によく似ていることが明らかになった(図 2B, C)。

3) AC 処理 CWD 感染シカ脳乳剤をシードとした異種間 PMCA

135°C、30 分間の AC 処理により、CWD 感染脳乳剤に含まれる PrP<sup>Sc</sup> 量は WB の検出レベル以下になった(図 3A)。次に、AC 処理 CWD 感染脳乳剤をシードにして Cer<sup>Ki</sup>脳乳剤を基質として連続

PMCA を行った。1 ラウンド目には PrPres の増幅は認められなかったが、2 から 4 ラウンド後 PrPres の増幅が認められた。増幅した PrPres のバンドパターンは無処理 CWD 感染脳乳剤シード PrPres とは異なっていた(図 3B)。以上の結果は、135°C AC 処理により CWD プリオンは完全に不活化されたが、それ以外以外のプリオン(サブストレイン)は脳乳剤中に残存していると考えられた。次に AC 処理 CWD 感染脳乳剤をシードとして Bo<sup>Tg</sup>脳乳剤を用いて PMCA を行った。その結果、AC 処理 CWD 感染 BH をシードとした PMCA も無処理 CWD 感染脳乳剤をシードとした場合と同程度の頻度で PrPres の生成が認められ、C-BSE 様 PrPres が生成する頻度も同程度であった(図 3C)。このことは、135°C AC 処理でも残存する極微量のプリオンから C-BSE 様 PrPres が増幅したと考えられた。

## D. 考察

1) RT-QuIC 法により L-BSE 経口接種カニクイザルの CSF および尿から陽性シグナルが得られた。この結果は、カニクイザルにおいて経口接種より L-BSE プリオンの伝達が成立する可能性が示唆された。今後接種前の体液を使って同様の実験を行い、さらに、脳をはじめとする各種組織についても RT-QuIC による L-BSE プリオンの検出を行う予定である。

2) 非定型スクレイピーには、H-BSE 様プリオンが含まれていると考えられ、非定型スクレイピーがウシへ伝達した場合、H-BSE 様プリオン病を発症する可能性が示唆された。過去の報告では、バイオアッセイと PMCA により、非定型スクレイピー分離株に C-BSE プリオンが含まれていることが示されており、本実験とは異なる結果が得られている。

3) 135°C AC 処理した CWD 感染脳乳剤を用いた一連の実験から、135°C AC 処理により CWD プリオンは完全に不活化されたが、CWD 以外のプリオンが AC 処理脳乳剤中に極微量含まれており、それらがシードとなり PMCA により C-BSE 様 PrPres が増幅したと考えられた。

## E. 結論

1) 体液の RT-QuIC で陽性シグナルが得られたことから、経口接種により、サルにおいて L-BSE の

感染が成立した可能性が示唆された。

2) 非定型スクレイパーには、H-BSE 様プリオンが含まれている可能性が考えられた。

3) CWD 感染シカ脳乳剤をシードとして生じた C-BSE 様プリオンは、PMCA により CWD プリオンが変化して生成したのではなく、サブストレインとして CWD 感染シカ脳乳剤にごく微量含まれていることが示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Atarashi R. RT-QuIC as ultrasensitive method for prion detection. *Cell Tissue Res*, 392(1):295-300., 2023.
- 2) Pasiona AD, Miyata H, Chida J, Hara H, Imamura M, Atarashi R, Sakaguchi S. Central residues in prion protein PrP<sup>C</sup> are crucial for its conversion into the pathogenic isoform. *J Biol Chem*, 298(9): 10238-10251, 2022.
- 3) Matsuura Y, Miyazawa K, Horiuchi M, Suzuki A,

Yokoyama M, Imamura M, Ikeda K, Iwamaru Y. Extended application of the rapid post-mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease. *Microbiol Immunol*, 66(5):212-215, 2022.

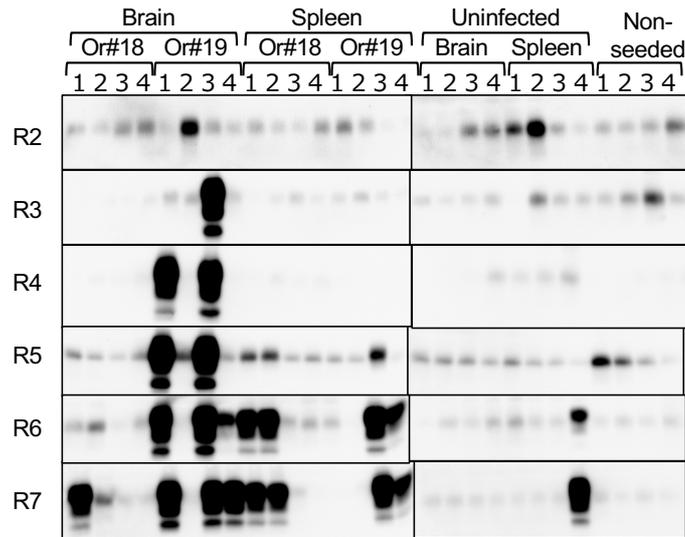
### 2. 学会発表

- 1) Imamura, M., Miyazawa, K., Matsuura, Y., Iwamaru, Y., Okada H., Takatsuki, H., Mori, T., Atarashi, R. H-BSE prions adapted to ovine PrP *in vitro* acquired C-BSE-like properties. Asian Pacific Prion Symposium 2022 (December, 15, 16, 2022, Fujisawa, 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

A



B

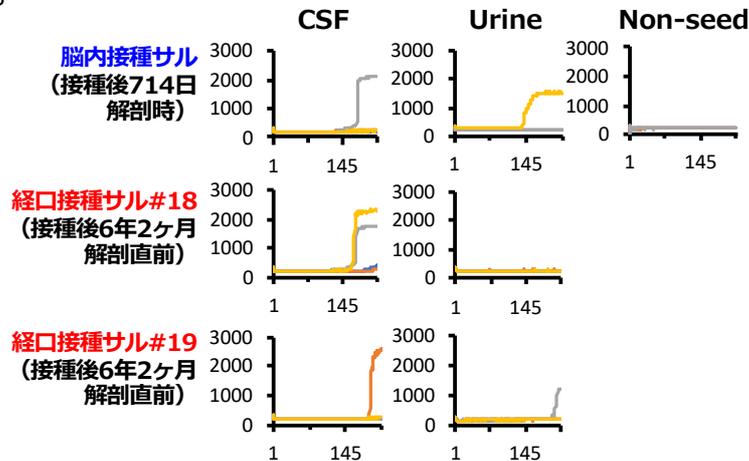


図 1. L-BSE 感染脳乳剤経口接種カニクイザルの脳および脾臓、脳脊髄液 (CSF)、尿からのプリオンの検出。  
 (A)L-BSE 経口接種サル 2 頭 (Or#18, Or#19) と非接種サル (脳と脾臓は別個体に由来) の 10% 脳および脾臓乳剤をシードとして野生型マウス脳乳剤を基質として quadruplicate で 7 ラウンドまで連続 PMCA を行った。経口接種サルは 2 個体とも脳および脾臓で PrPres の増幅が認められた。また、非接種サル脾臓でも PrPres の増幅が認められた。(B) 脳内接種サルおよび経口接種サル 2 頭の脳脊髄液、尿を直接反応液に加え、RT-QuIC を行った。脳内接種サルの CSF と尿から陽性シグナルが得られた。

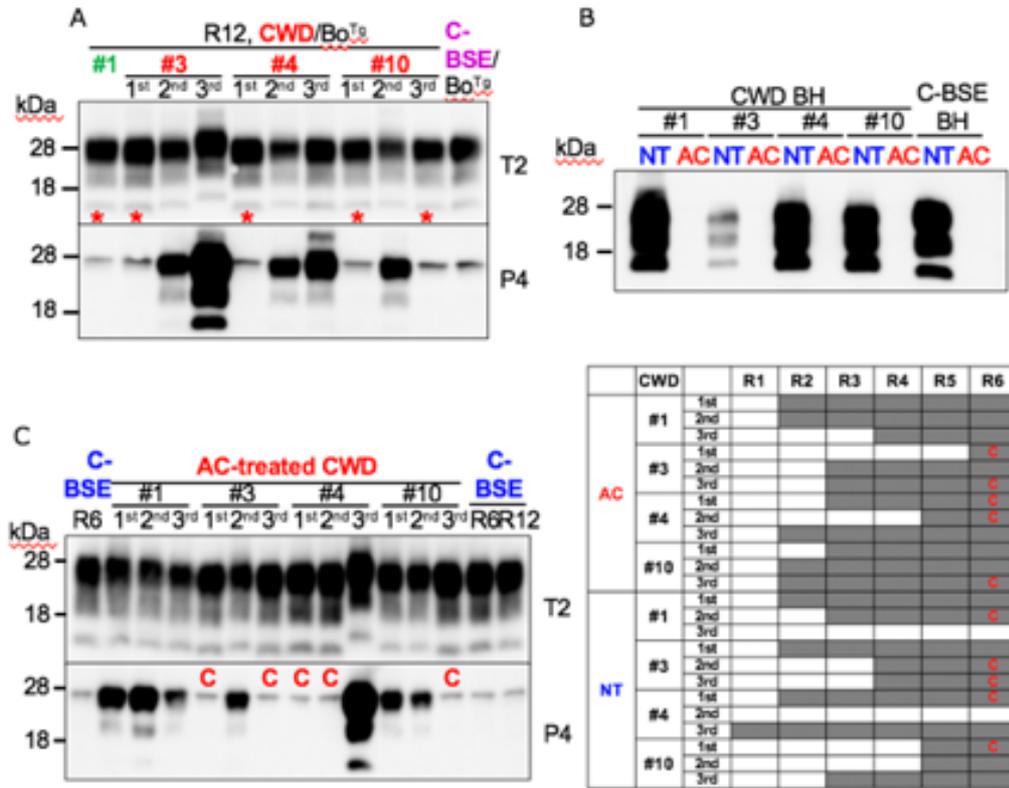


図2. CWD感染脳乳剤(BH)をシードにした異種間PMCA。(A) 4個体分のCWD感染BH(#1, #3, #4, #10)をシード、ウシPrP発現形質転換(BoTg)マウスBHを基質にして12ラウンドまで連続PMCAを行った。#1以外増幅したすべてのPrPresについて2種類の抗PrP抗体(T2, P4)でウエスタンブロッティング(WB)を行った。P4抗体のエピトープは89-104aa(ヒツジPrP)である。アスタリスクはC-BSE様PrPresを示す。(B)4頭分の10% CWD感染シカBHを135°C、30分間オートクレーブ(AC)処理した。NTは無処理を示す。PK処理後、各脳乳剤(脳当量125 μg)を抗PrP抗体でWBした。(C) AC処理CWD感染シカBHをシードとしてBoTgマウスBHを用いたPMCAを行った。4個体分のAC処理および無処理感染BHについて3回ずつ6ラウンドまで連続増幅した(右表)。グレーボックスはPrPresの形成が認められたことを示す。表と図にあるCはC-BSE様PrPresを示す。AC処理BHからも無処理BHと同様の頻度でC-BSE様プリオンが増幅した

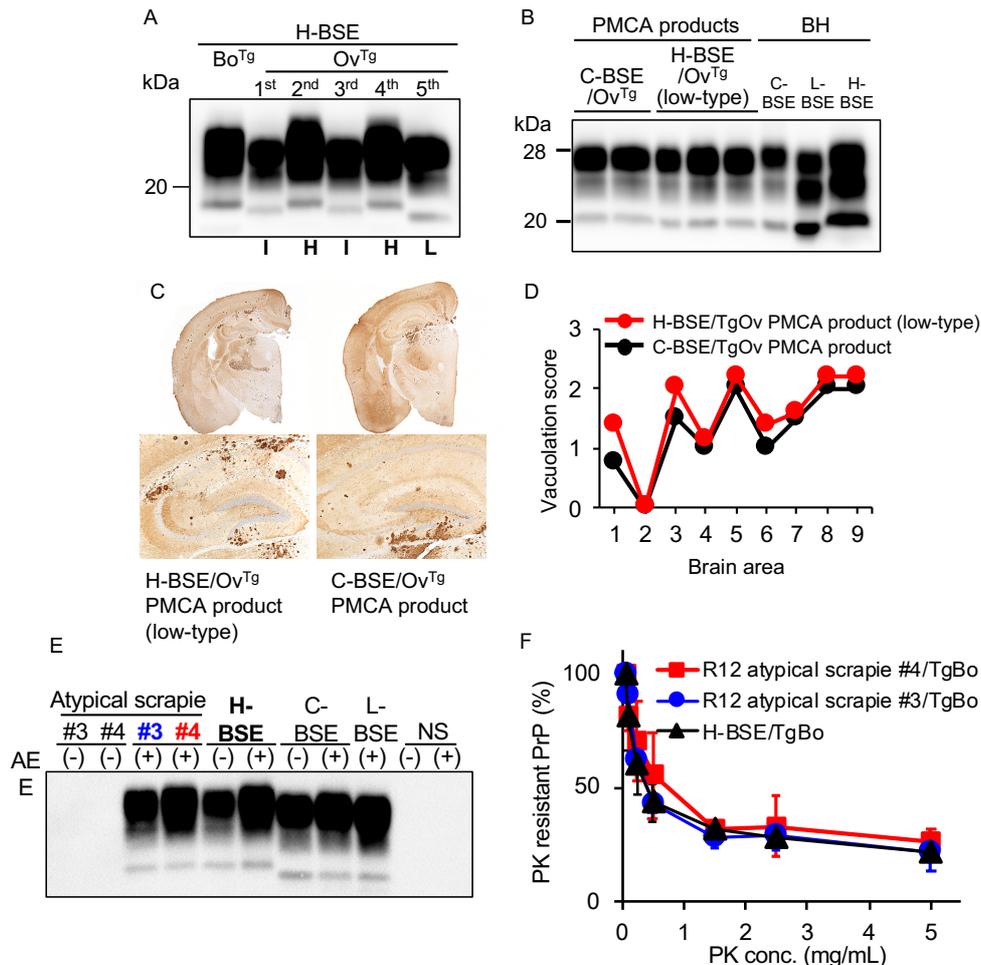


図3. H-BSE 感染脳乳剤をシードにした異種間 PMCA および low-type PMCA 産物のバイオアッセイ. (A) H-BSE 感染脳乳剤をシード、ヒツジ PrP 発現形質転換(OvTg)マウス脳乳剤を基質にして 12 ラウンドまでの連続 PMCA を 5 回繰り返した。分子量が最も高い 2nd、4th PrPres を high-type(H)、中間の分子量の 1st、3rd PrPres を intermediate-type (I)、最も分子量が低い 5th PrPres を low-type(L)とした。(B) low-type H-BSE/OvTg PMCA 産物および C-BSE 感染脳乳剤シード OvTg PMCA 産物を OvTg マウスに脳内接種した。それぞれ接種から平均  $428 \pm 38.1$  日、 $407.0 \pm 46.1$  日後に発症致死した。C-BSE/OvTg PrPres 接種マウスについては 2 個体、low-type H-BSE/OvTg PrPres 接種マウスについては 3 個体を用いて脳乳剤を調製し、WB を行った。C-BSE、L-BSE、H-BSE 感染ウシ脳乳剤も WB した。(C) low-type H-BSE/OvTg PMCA 産物および C-BSE/OvTg PMCA 産物を接種し、発症したマウスの脳を抗 PrP 抗体により免疫染色を行った。(D) low-type H-BSE/OvTg PMCA 産物および C-BSE/OvTg PMCA 産物を接種し、発症したマウスの脳における空胞変性の分布パターンを調べた。脳領域は次の通りである。1, dorsal medulla; 2, cerebellar cortex; 3, superior colliculus; 4, hypothalamus; 5, thalamus; 6, hippocampus; 7, septal nuclei of the paraterminal body; 8, cerebral cortex at the level of 4 and 5; 9, the cerebral cortex at the level of 7. (E) AS 感染 BH シード BoTg -PMCA 産物の WB のバンドパターンを 定型、非定型 BSE シード BoTg -PMCA 産物と比較した。AS シード BoTg PrPres の WB バンドパターンは H-BSE シード BoTg PrPres と非常によく似ていた。(F) AS シード BoTg PrPres と H-BSE シード BoTg PrPres との PK 抵抗性に有意差はなかった。

### 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 小野 文子 岡山理科大学 獣医学部 准教授

研究協力者 柴田 宏昭 社団法人予防衛生協会

木村 展之 岡山理科大学 獣医学部 教授

#### 研究要旨

人への感染性プリオンの経口感染リスクを評価する目的で、3 継代した L-BSE サル順化脳乳剤をカニクイザル 2 頭への経口接種を行い、継続的な検体採取および臨床病態の観察を行った。また、プリオン病感染初期病態の解析を行うことを目的として、L-BSE をカニクイザルに脳内接種し、継続的な検体採取を行い、接種後 398 日目に安楽死解剖を実施した。同継代株を接種した 2 頭では接種後 405 日、485 日で神経症状が認められ、症状は進行し、それぞれ、接種後 714 日目、722 日目に安楽死を実施している。今回の 2 頭は明らかな神経症状が認められていない発症前の病態解析を行う目的で接種後 398 日目に安楽死解剖を実施した。MRI では軽度に脳室が拡張し、病理組織検索では病変は発症後解剖を行って 2 頭に比べ、軽度ではあるものの、腰髄まで感染性プリオンの沈着と空胞変性が認められた。脳脊髄液のタウ蛋白の解析では、タウ蛋白および、AT270 リン酸化タウ蛋白が検出された。以上のことより、L-BSE プリオンは神経親和性と高い病原性を持つことから神経系曝露への感染対策の重要性が示唆された。また、リン酸化タウ検出が、早期診断に有効であることから、L-BSE カニクイザル感染モデル系は病態解明、感染リスク評価に有用なモデル系であると考えられた。

#### A. 研究目的

非定型 BSE(牛海綿状脳症)に関しては、発生機序、ヒトへの伝達性について十分に解明されておらず、食品安全委員会の評価結果においても、非定型 BSE の知見は限られており、最新の知見について引き続き収集する必要があるとされている。本研究ではプリオン病の発生機序、ヒトへの伝達性に関する知見を収集し、非定型 BSE 等に対するリスク管理措置の見直しに資することにより厚生労働行政の課題に大きく貢献できる。申請者はこれまで非定型牛海綿状脳症（非定型 L-BSE）由来プリオンをカニクイザルに接種することで、sCJD に類似した臨床症状および病理所見を再現できることを見出している。ヒトおよび霊長類モデルにおいて、一方、プリオン病感染初期病態について詳細な解析が行われていない。本研究では初期段階での病態解析によって、プリオン病の特徴的なバイオマーカーや病理学的な変化について検討を行う。また、これまで霊長類を用いた感染経口感染モデル系で発症モデルは確立されてい

なことからサル馴化高病原性株の大量投与による経口感染リスクについて継続研究を実施することにより、プリオン病のリスク管理に資するさらなる知見を集積し、プリオンのヒトの健康におよぼす伝達リスクを評価し、公衆衛生上の安全対策等に役立てる。

#### B. 研究方法

##### 1) 供試動物

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）で出生・育成された投与時 1.5~2.0 歳の雄カニクイザル 6 頭を用いた。供試動物は、ABSL3 施設内の陰圧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

L-BSE 経口接種群：BSE (BSE JP/24 佐世保：L-BSE) をカニクイザル脳内接種し 3 継代目の#30 と#33 の脳を 20%脳乳剤をカニクイザル 2 頭(#30、#31) に 2021 年 1 月 27 日から 2021 年 3 月 17 日に経口投与を行った。

L-BSE 脳内接種群：BSE (BSE JP/24 佐世保：L-BSE) をカニクイザル脳内接種し 1 継代目の#15 の 10%脳乳剤をカニクイザル 2 頭 (#34、#35) に 2021 年 11 月 16 日に脳内接種を行い、明らか臨床症状が発現していない接種後 398 日目、2022 年 12 月 19 日に安楽死解剖を実施した。

## 3) 接種方法

経口接種：塩酸ケタミン (10mg/kg) を筋肉内投与し麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、20%脳乳剤 5ml を週 2 回、4 週 (計 8 回：総投与脳重量 8g) 投与した。投与後に嘔吐抑制のため、塩酸メトクロプラミド (2.5mg/head) の筋肉内投与を行った。

脳内接種：塩酸ケタミンとキシラジン麻酔下で、無菌的に皮膚を切開し、頭蓋骨に直径 2 mm の穿孔部を作製し、片側被殻に 10%BSE 発症サル脳乳剤 200  $\mu$ L を接種する。接種後 3 日間抗生物質および、鎮痛剤を投与した。

## 4) 検体採取

投与・接種前及びその後経時的 (3 ヶ月に 1 回程度) および解剖時に、塩酸ケタミン (7mg/kg) もしくはメデトミジン (0.03mg/kg)、ミタゾラム (0.01mg/kg) およびブトルファノール (0.02mg/kg) の混合麻酔を筋肉内投与し麻酔下において、大腿静脈から血液 (6.3ml)、腰椎椎間から脳脊髄液 (0.5~1ml)、口腔内から唾液を採取した。唾液採取は生理食塩水 2ml で頬袋内を洗浄して回収した。尿は前日より汚物トレーにビニールシートを敷いて自然排尿を採取した。

## 5) 皮質脳波測定

メデトミジン (0.03mg/kg)、ミタゾラム (0.01mg/kg) およびブトルファノール (0.02mg/kg) の混合麻酔下で実施した。脳波測定は脳波計 (EEG-1100 [日本光電]) を用いた。頭部をバリカンにより剃毛後、皿電極を脳波測定用ペーストを用いて、前頭葉から後頭葉にかけて左右各 4 か所

に設置し、8 電極により単極誘導および双極誘導により暗視野測定シールド内で未刺激状態で測定後 1~24HZ の光刺激下での脳波を測定した。測定終了後はメデトミジン拮抗薬アチパメゾール塩酸塩 (0.1mg/kg) を投与し、覚醒を速やかに誘導した。実施頻度は未発症期および、神経症状発現と症状の進行に応じて 1 か月~半年の間隔および安楽死時に行った。

## 6) 行動解析

### 1. 行動観察

行動観察 (神経・精神症状評価)

定期的にビデオ撮影を行い、スコアリングに必要な症状を抽出し、再評価をおこなった。ビデオ撮影は 15 分間実施し撮影開始 5 分後に給餌を行い、摂食行動の観察をおこなった。神経・精神症状評価の抽出は、下記のヒトプリオン病指標項目について、サルの行動から客観的にスコアリングできる指標を作成した。

プリオン病主要観察項目

①神経症状：運動失調、振戦、ミオクローヌス、姿勢反射障害、動作緩慢、痙性歩行、筋力低下、歩行不能

②精神症状：抑鬱状態、自傷行為、食欲不振、あくび、驚愕反応、不穏

### 2. 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おこなった。

### 3. 食物回収試験 (高次脳機能解析)

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、評価をおこなった。

## 7) 脳脊髄液タウ蛋白の検出

脳脊髄液は、清浄区域での解析を行うために、10%SDS, 0.2M DDT, 8M Urea を含むサンプルバッファーとして 98°C 10 分間加熱処理後の検体を用いてウエスタンブロッティングを行った。一次抗体は、リン酸化タウ検出には、抗ヒト PHF-Tau モノクローナル抗体 AT270 を用いた。

## 8) MRI 撮像

神経症状が一過性に認められた#25 において、MRI 撮像撮像を実施した。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。血液抗凝固処置後安楽死を行った動物をアクリル製密封型コンテナに動物を保定して MRI 撮像室への移動を行った。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。MRI 撮像は安楽死を行った死体を完全密封し、ABSL3 施設より搬出後撮像し、ABSL3 施設へ再搬入した後解剖を行った。

## 9) 安楽死・解剖

塩酸ケタミン (7mg/kg) もしくはメドミジン (0.03mg/kg)、ミタゾラム (0.01mg/kg) およびブトルファノール (0.02mg/kg) の混合麻酔下でサンプリングを実施した後、ペントバルビタール (150ml/kg) を伏在静脈より投与し安楽死をおこなった。MRI 撮像を行う個体では麻酔下でへパリンナトリウムを 1 万単位静脈内投与後に安楽死を実施した。解剖は脳、脊髄、脊髄神経根、末梢神経、リンパ節、眼球、鼻腔粘膜、骨髄、全身臓器を採取し、凍結およびホルマリン浸漬を行った。

### (倫理面への配慮)

BSE 接種動物はすべて 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。

動物の苦痛を考慮し、動物が以下の状態になった時点を人道的エンドポイントとして安楽死を行うこととした。プリオン病以外の感染症や個体の病態が発現した場合は獣医学的判断により抗生物質投与、輸液等の適切な治療 (3 日以上食欲廃絶が認められる場合は輸液治療を開始する) を実施するが、1 週間以上の食欲廃絶、横臥、うずくまる等の動物の異常な行動、外観から持続的に苦痛を感じていることが認められ、予後不良と判断した場合。プリオン病発症後、神経症状が進行し、自力での摂餌飲水が困難となった場合、精神症状のため、食欲廃絶状態が 1 週間以上続く場合。当該期間において人道的エンドポイントの適応はなかった。

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・栄養研究所及び岡山理科大学動物動物実験委員会の承認を得ておこなった。病原体の取扱については、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おこなった。

## C. 研究結果

### 1) L-BSE 脳内接種群

L-BSE サル継代脳乳剤の大量経口投与を行った 2 頭は投薬後、790 日を迎え明らかな臨床症状は認められておらず、継続観察とした。

2) L-BSE サル継代脳乳剤の脳内接種を行った 2 頭は、明らかな臨床症状が認められていない、投薬後 398 日目に安楽死、解剖を行った。試験期間中高次脳機能の評価を行う目的で食物回収試験を行ったが、接種前からの馴化段階から、2 頭とも試験への適応性がなく、評価できなかった。神経症状、精神症状スコアでは明らかな発症は確認できなかった。脳脊髄液中の Tau 蛋白質では、#35 において感染 233 日目から 342 日で増加傾向看られた。解剖直前の 399 日目では減少した。AT270 リン酸化 Tau 抗体に対して、感染末期の 2 頭とともに、Tau 蛋白質の増加が認められた#35 に

において 342 日目に検出された (図 1)。  
 安楽死直後の MRI 所見では軽度な脳室の拡張が観察された。#35 では、左偏桃体下部に嚢胞が観察され、解剖時剖面より透明髄液の漏出が認められた(図 2)。病理組織所見では炎症像は認められなかったが軽度ヘモジデリン沈着が認められた。病理組織所見では発症末期に解剖した 2 頭と比較して空胞変性、プリオンの沈着は軽度であったが、大脳、小脳、頸髄から腰髄までの脊髄に病変が認められた(表 1)。

#### D. 考察

L-BSE サル継代脳乳剤の大量経口投与により食の安全とともに、クールー病のリスクについて継続して検討を行う。

L-BSE サル継代脳乳剤接種カニクイザルについて臨床症状発現前より、脳の萎縮、広範なプリオンの沈着と空胞変性が進行していることから、

脳脊髄液の Tau 蛋白の解析では脳の変性のステージにより検出レベルに変動があるものの、発症前診断としての有用性が示唆された。今回、アルツハイマー診断で近年注目されている PTh217 抗体による検索では感染初期カニクイザルからの検出はできなかったが、AT270 抗体によるリン酸化タウは早期診断に有用性が示唆された。

#### E. 結論

L-BSE サル馴化株脳内接種したカニクイザルにおいて、発症前の病態解析において、脳の軽度萎縮および広範な異常プリオンの沈着と空胞変性が認められたことから、L-BSE プリオンは神経親和性と高い病原性を持つことから神経系曝露への感染対策の重要性が示唆された。また、リン酸化タウ検出が、早期診断に有効であることから、L-BSE カニクイザル感染モデル系は病態解明、感染リスク評価に有用なモデル系であると考えられた。

#### 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

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

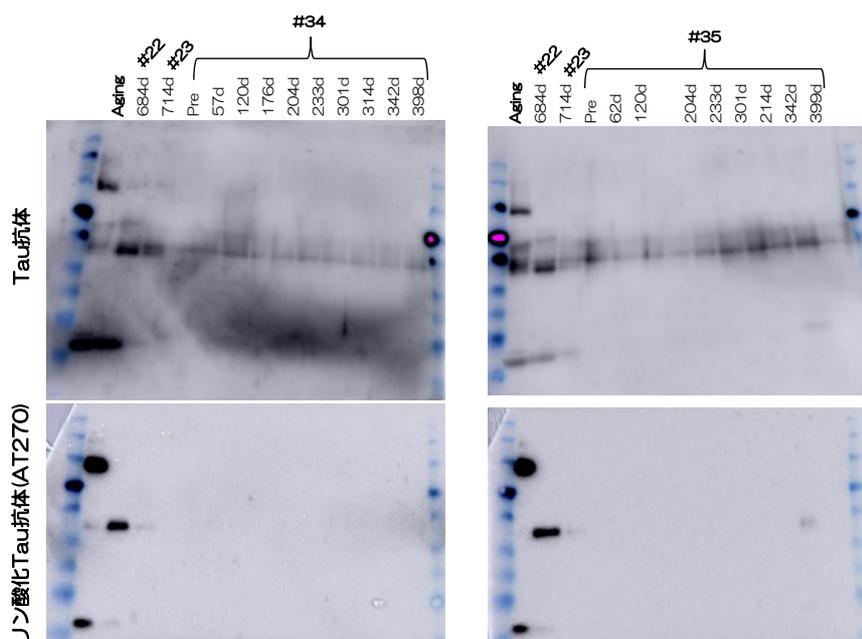


図 1. 非定型L-BSEサル継代脳乳剤接種カニクイザル (P2) 脳脊髄液中のTauタンパク質の検出

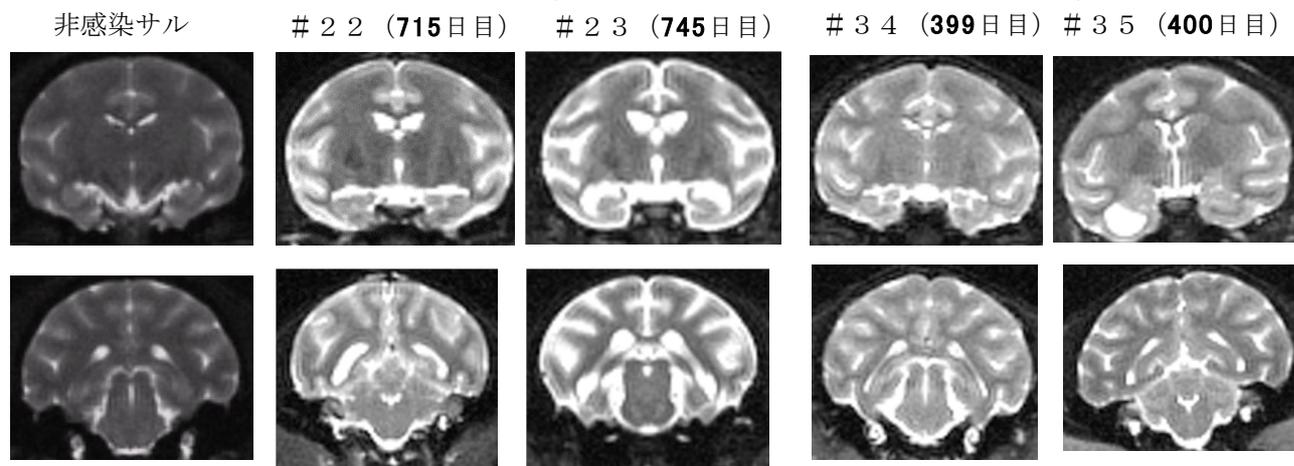


図2. 非定型L-BSEサル継代脳乳剤接種カニクイザル (L-P2) 安楽死時のMRI画像 (T2強調画像)

表1 非定型 L-BSE サル継代脳乳剤脳内接種カニクイザル (L-P2) の病態

解剖年数	2年			1.1年		
臨床症状	起立困難、振戦、ミオクローヌス			無症状		
MRI 所見	脳室拡張、脳萎縮			脳室軽度拡張		
病理所見	Prion 検出	空胞変性	グリア増生	Prion 検出	空胞変性	グリア増生
大脳皮質	砂粒状多数	重度	多数	砂粒状中等度	軽度	不明瞭
大脳髄質	砂粒状多数	中等度	多数	砂粒状少数	中等度	多数
海馬	砂粒状多数	中等度	中等度	砂粒状少数	軽度	中等度
視床	砂粒状多数 プラーク沈着	中等度	中等度	砂粒状中等度	中等度	多数
小脳	砂粒状多数 プラーク沈着	中等度	繊維性多数	砂粒状少数 プラーク沈着	中等度	繊維性

## 4. 非定型 BSE 感染カニクイザルの病理学的解析

分担研究者 飛梅 実 国立感染症研究所 感染病理部 客員研究員

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

研究協力者 高橋 礼典 東京医科大学 臨床病理科

### 研究要旨

本研究では、定型 BSE プリオンを接種されたマカクサル（*Macaca mulatta*）の病理学的変化がヒトにおける vCJD と類似の表現型を示すことを踏まえ、L-BSE および H-BSE 等の非定型 BSE のヒトへの伝播の可能性ならびに伝播した場合の病理学的な特徴を明らかにすることを目的とする。

これまでの研究において、カニクイザルを用いた感染実験では L-BSE および H-BSE 由来プリオンの経口接種による伝達性は確認出来ていない。一方、L-BSE 由来プリオンは脳内接種によりサルへの伝達性、病原性を有することを明らかにしてきた。また、L-BSE 由来プリオンの脳内接種により誘導される病理像がヒト弧発性プリオン病と同様の病理像を示すことをふまえ、L-BSE 由来プリオン接種サルのヒト弧発性プリオン病モデルとしての有用性について検討した。

### A. 研究目的

ウシにおけるプリオン病は定型 BSE に加え非定型 BSE が存在することが報告されている。定型 BSE は肉骨粉を原因としてウシで蔓延したと考えられており、ヒトへも経口的に感染し vCJD を誘導する。一方、非定型 BSE のヒトへの感染事例は現在報告されておらず、本研究班の検討においても、非定型 BSE の食を介したヒトへの伝達性は低いことが示唆されている。一方、L-BSE 由来プリオンは脳内接種によりカニクイザルへの伝達性を示し、ヒトへの伝達性の可能性が示唆されると同時に、その組織病理像はヒト弧発性プリオン病に類似する。本研究では、ヒトに非定型 BSE 由来プリオンが伝達した場合の組織病理像を明らかにすると同時に、サルを用いた感染実験系のヒト弧発性プリオン病モデルとしての有用性について検討する。同時に、ヒト検体を用いて、正常型プリオンの中枢神経系での動態を解析し、アルツハイマー病など蛋白変性疾患発現時における正常型プリオンタンパク質の関与について検討する。

### B. 研究方法

1) L-BSE 由来プリオン接種早期のカニクイザル組織病理像の確認。

ヒトプリオン病 (Creutzfeldt-Jakob Disease) は人種を問わず約 100 万人に 1 人の頻度で発生すると報告されている。このうち、原因不明で発症する弧発性ヒトプリオン病 (sCJD) の典型例では亜急性の病態進行を示し、発症から 2 年以内での死亡がピークとなる。死亡時の中枢神経系の病理学的な解析では、特徴的な皮質の空胞変性とシナプス型のプリオン沈着を両側性に認める。この、ヒトプリオン病の発症前診断はほぼ報告がなく、病期早期の病理学的変化は不明である。

本研究では、L-BSE 脳内接種による病理学的特徴がヒトプリオン病と類似することを踏まえ、L-BSE 由来プリオン脳内接種後早期のカニクイザルを解剖し、中枢神経の組織病理学的特徴ならびにプリオンの分布について検討した。

2) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

脳組織中の正常型プリオンタンパク質の免疫組織科学的手法を用いた局在の検討は少ない。正常型プリオンタンパク質は病理標本中では不安定で、長時間のホルマリン固定組織では免疫組織化学的手法を用いた検出は難しい。我々は、脳組織の固定にパラフォルムアルデヒド (PFA) を用い、迅速な固定を行うことで安定して正常型プリ

オンタンパク質を検出できることを示してきた。PFA を用いて固定された組織標本の網羅的なプリオンおよびアミロイドβ染色を行い、症例検索を継続した。

#### (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。

また、ヒト組織を用いた検討では、感染症研究所ならびに東京医科大学での倫理審査を経て行っている。

### C. 研究結果

#### 1) L-BSE 由来プリオン脳内接種サルの発症前組織病理学的解析

ヒト弧発性プリオン病の病態進行は亜急性で発症後2年以内の死亡が大半を占める。L-BSE 由来プリオン脳内接種サルにおいても同様の病態進行を示す。ヒト弧発性プリオン病ならびに L-BSE 接種サルの発症後の病理組織学的特徴は類似しており、両側性の空胞変性とシナプス型のプリオン沈着を示す。今回行った L-BSE プリオン接種サルのプリオン病発症前の組織所見では、両側性の空胞変性とシナプス型のプリオン沈着を明瞭に認めた。

#### 2) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

PFA 固定された脳組織の網羅的な染色を行った結果、アミロイドプラークの形成と同領域での正常型プリオンの消失を特徴とする症例を1症例追加で見いだした。本症例に関しても、正常型プリオンが維持される部位と正常型プリオンが消失しアミロイドプラークが形成される領域の LC/MAS 解析を行い、存在量に変動のあるタンパク質を検出した。前年度に解析した症例と比較検討し、両症例に共通して変動するタンパク質の同定を進め、正常型プリオンタンパク質消失部位で増加するタンパク質 30 種、正常型プリオンタンパク質が維持される部位で増加するタンパク質 23 種を同定した。

### D. 考察

#### 1) L-BSE 由来プリオン脳内接種サルの発症前

#### 組織病理学的解析

カニクイサルを用いた解析では、発症前においても両側性の空胞変性およびプリオンの沈着が認められた。また、プリオンの沈着パターンも発症後のパターンと同様に脳内ではシナプス型の沈着を示す。これらより、脳内接種後早期に中枢神経系全体にプリオンは拡散することが示唆された。誘導される病理学的な変化はヒト弧発性プリオン病と極めて類似し、また病態の進行も亜急性の経過をたどることから、L-BSE 由来プリオンを用いた検討はヒト弧発性プリオン病の理解に資する事が示唆された。

#### 2) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

、同一脳組織内で神経細胞の正常型プリオンタンパク質発現陽性部位と陰性部位が存在することが見いだされ、異なる症例においても変動が確認される共通のタンパク質の同定を進めており、それぞれのタンパク質の正常型プリオンタンパク質、アミロイドβの動態へ与える影響について解析を進める。

### E. 結論

#### 1) L-BSE 由来プリオン脳内接種サルの発症前組織病理学的解析

L-BSE 由来プリオン脳内接種後のサル中枢神経系では接種後早期に中枢神経全体に広がることが示された。

2) 脳組織の PFA 固定により安定的に免疫組織化学的手法により正常型プリオンタンパク質が検出できた。正常型プリオンタンパク質の生体内での機能ならびに蛋白変性疾患に与える影響は不明であり、更なる解析の必要性が示唆される。

### F. 健康危険情報

特記事項なし

### G. 研究発表

1. 論文発表  
該当無し

2. 学会発表

1) 該当無し

2. 実用新案登録  
該当無し

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得  
該当無し

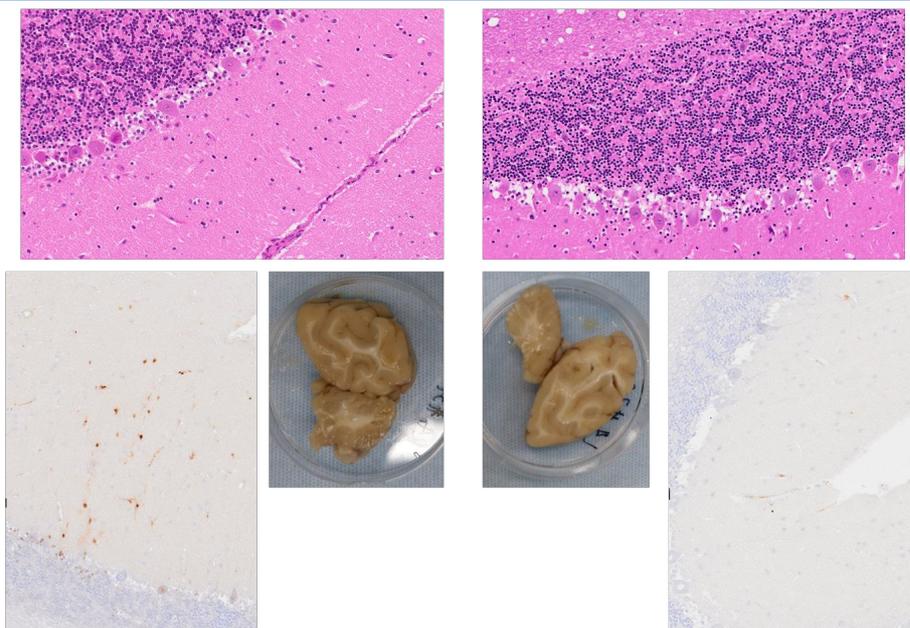
図1

L-BSE由来プリオン脳内接種サル（発症前大脳病理像）



図2

L-BSE由来プリオン脳内接種サル（発症前小脳病理像）



## 5. H-BSE プリオンのカニクイザルへの初代伝播実験の生化学解析 およびサル馴化 C-BSE プリオンが持続感染可能な培養細胞の開発

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 小野 文子(岡山理科大 獣医学部)

柴田 宏昭(岡山理科大 獣医学部)

飛梅 実(国立感染症研究所 感染病理部)

中村 優子(国立感染症研究所 細胞化学部)

### 研究要旨

H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザル4個体(脳内接種; #024, 025、経口投与; #026, 027)のうち、R3 年度までに#024 と#027 を安楽殺に処し、脳への PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の有無をウェスタンブロット法(WB 法)により検索した。PrP<sup>Sc</sup> は検出限界以下であり、脳おける H-BSE プリオンの明らかな増殖・蓄積は認められなかった。R4 年度は、脳以外の神経組織およびリンパ組織への PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の有無を WB 法により検索した。また、観察を継続した#025 と#026 を安楽殺に処し、脳およびリンパ組織への PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の有無を WB 法により検索した。その結果、H-BSE プリオンの明らかな増殖・蓄積は認められなかった。4個体の実験結果から、C-および L-BSE プリオンと比較して H-BSE プリオンは霊長類へ非常に伝播しにくいことがわかった。

また、ヒトまたは霊長類の PrP<sup>C</sup> を発現し、プリオンが感染可能な培養細胞があれば、動物由来プリオンのヒトへの感染リスク評価等への有用な研究材料になると期待される。R3 年度までに、ヒト由来の神経芽細胞腫由来の一細胞にカニクイザル PrP<sup>C</sup> を発現させると、サル馴化 C-BSE プリオンが持続感染できることを見出した。ただし、この細胞は内在性ヒト PRNP によるヒト PrP<sup>C</sup> を発現しており、外来的に導入・発現させた PrP<sup>C</sup> と相互干渉することが懸念される。このため、本年度はゲノム編集により内在性 PRNP を欠失させたノックアウト細胞を作出した。ノックアウト細胞にカニクイザル Prnp を導入した細胞は、サル馴化 C-BSE プリオンの持続感染を維持することが確認できた。

### A. 研究目的

変異型 CJD (vCJD) との因果が確立している C-BSE プリオンとは異なり、非定型 L-/H-BSE プリオンについてはヒトへのリスクを含めて未知の点が多いが、本研究班のこれまでの研究から、少なくとも L-BSE プリオンはヒト・モデルとしてのカニクイザルへ脳内接種により効率よく伝播することが明らかになっている。一方、H-BSE プリオンのヒトあるいはヒト・モデルへの感染性は不明であり、その検討・評価は課題として残されていた。本研究では、H-BSE プリオンをカニクイザルへ脳内接種または経口投与して、この課題に取り組むことを目的とした。

また、実験動物を用いる感染実験はプリオン研究において重要であるが、動物実験の代替/削減が可能な培養細胞を用いる *in vitro* 実験系の開発も必要である。ウシ由来の C-BSE プリオンが持続的に感

染・増殖できる細胞として、これまでにマウス神経細胞に由来する GT1 細胞などが知られている。しかし、BSE プリオンあるいは BSE プリオンが他の動物種へ伝播・馴化したプリオンが安定して持続感染できるヒト由来細胞ないし霊長類由来細胞は、研究分担者が知る限りにおいて無い。研究班が所有するウシ由来 BSE プリオンやカニクイザル馴化 BSE プリオンが持続的に感染する培養細胞が得られれば、BSE プリオンについての研究、とりわけヒト Prnp のさまざまな多型の違いと BSE プリオンの感染リスクの相関、を *in vitro* で探索することが可能となる。そこで本研究では、サル馴化プリオンが持続感染・増殖できる細胞を得ることを目的とした。

### B. 研究方法

1) H-BSE プリオンのカニクイザルへの初代伝播実験

の生化学分析

H-BSE 罹患ウシの脳乳剤をカニクイザルへ脳内接種ないし経口投与した(接種/投与、経過観察および安楽殺・採材は、小野、柴田による)。以下の経過期間を経た個体を安楽殺に処し、各採材部位の異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の蓄積を 3F4 抗体を用いるウエスタンブロット法(常法)により調べた。

個体 No	投与ルート	観察期間
#024	脳内	4 年 10 ヶ月
#025	同上	5 年 4 ヶ月
#026	経口	6 年 1 ヶ月
#027	同上	4 年 10 ヶ月

陽性対照として C-BSE プリオンを脳内接種(初代伝播)したカニクイザル(#011)の脳(前頭葉)を用いた。また、陰性対照として非感染ザルの脳、扁桃、回腸、および腸間膜リンパを用いた。

#### 2) 研究に供したカニクイザルの *Prnp* の配列分析

これまでの研究で使用したカニクイザルについて、*Prnp* の配列解析を行なった。ゲノム DNA を鋳型として、primer-1: 5'-TTCATCAAGTCCATAACTTAGGGTCAG-3'、primer-2: 5'-CCTATCAGGGACAAAGAGAGAAGCAAG-3'、および KOD plus DNA polymerase (Toyobo Co. Ltd.) もしくは Ex Premier DNA polymerase (Takara Bio Inc.) 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 断片について、dideoxy 法により塩基配列分析を行った。

#### 3) プリオンが増殖できる培養細胞株の開発

細胞バンクから入手したヒト由来の神経芽細胞腫由来の一細胞にカニクイザル PrP<sup>C</sup> を恒常的に発現させ、この細胞を C-BSE プリオンの感染により終末期に至ったカニクイザル(#007)の脳ホモジネートとともに培養すると、培養継代を重ねても PrP<sup>Sc</sup> の持続的産生が認められることを R3 年度までの研究で発見した。

この細胞の内在性 *PRNP* の 129 番目アミノ酸のコードンは ATG (Met)/GTG (Val) のヘテロ接合型だった。研究リソースとしてこの細胞を活用することを考えると、内在性のヒト PrP が発現していないことが望まれる。そこで、本年度は CRISPR/Cas9 法により *PRNP* を欠失させた。ターゲット配列は、研究分担者らの既報 (Okemoto-Nakamura *et al.*, *BPB Reports*, 2, 73

82019)) に準じた部位を選んだ。

#### (倫理面への配慮)

カニクイザルを宿主とするプリオンの感染実験は医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験施設で行い、「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並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省に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、医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。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」、「実験室安全操作指針」に従った。

#### C. 研究結果

1) 採材した各組織への PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の有無をウエスタンブロット法により検索した。脳内接種ザル(#024、025)については、前頭葉、側頭葉、後頭葉、小脳、被殻、脳幹、海馬、延髄、脊髄、眼球、視神経、坐骨神経、扁桃、顎下腺、下顎リンパ、鼻腔粘膜、脾臓を調べた。経口投与ザル(#026、027)については、上記の脳各部位の他に、回腸、腸間膜リンパ、扁桃、顎下腺、腋下リンパ、鼠径リンパ、鼻腔粘膜、脾臓を調べた。

その結果、プリオンに感染していない陰性コントロール・サルと同様に、H-BSE プリオンを脳内接種または経口投与したカニクイザルの脳のいずれの部位にも PrP<sup>Sc</sup> に由来する陽性シグナルは検出されなかった[図1、表1]。

2) 研究で用いたカニクイザルの PrP コード領域を含む全長 1.2kbp (-339~+883) の DNA 塩基配列を解読した。H27 年度までに 11 個体(#007、010、011、014、015、016、017、020、021、022、023)の分析を済ませていたが、本年度は 10 個体(#018、019、024、025、026、027、032、033、034、035)について解析した。これにより、本研究班およびそれ以前の研究班(厚生労働科学研究 食品の安心・安全確保推進事業、食品の安全確保推進事業)で使用したカニクイザル全個体について分析を完了した[表2]。

なお、#026(H-BSE プリオン経口投与ザル)は、対立遺伝子の1つにおいて、オクタペプチド配列が1リピート欠失していると判断された。1)の感染実験の結果は、このリピート欠失によって H-BSE プリオンへの感受性は亢進しないことを示している。

3) カニクイザル馴化 BSE プリオンが持続感染できる培養細胞はこれまで知られていなかったが、R3 年度までにカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子 (*Prnp*) を導入したヒト神経芽細胞腫由来の一細胞が有望であることを見出した。この細胞を新たな研究リソースとして活用することを目指し、内在的に発現しているヒト PrP の干渉を排除するために、本年度はゲノム編集により内在性の *PRNP* (ヒト・プリオン蛋白質遺伝子) を欠失させたノックアウト細胞を作出した。ゲノム編集は、Cas9 蛋白質 (New England Biolab) /sgRNA 複合体の細胞への導入による方法と、Cas9/sgRNA をコードする plasmid (pGuide-it, Clontech) による方法を試みたが、後者の方法によりノックアウト細胞を最終的に得た。ノックアウト細胞にカニクイザル *Prnp* を導入した細胞は、サル馴化 C-BSE プリオンの持続感染を維持することが確認できた。

#### D. 考察

1) 生化学分析 (ウェスタンブロット法) ならびに本研究班の分担研究 (経過観察: 小野、病理・免疫組織分析: 飛梅) の結果から総合的に判断すると、H-BSE プリオンを脳内接種ないし経口投与したカニクイザル計4個体には、プリオンの明らかな伝播は認められなかった。従来型 BSE (C-BSE) や非定型 L-BSE プリオンのカニクイザルへの感染実験研究 (脳内接種) では、プリオンに暴露した個体は 2~5 年の経過後に脳および幾つかの神経組織プリオンが蓄積していたことから、H-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播効率は、C-BSE や L-BSE プリオンよりも著しく低いと考えられた。

カニクイザルとヒトにおいてプリオン感受性が対等であるのかという点は確立されておらず、また、限られた個体数のカニクイザルの実験結果であることから、ヒトの H-BSE プリオンの感染リスク評価は依然として慎重であるべきだが、変異型 CJD モデルとしてのカニクイザルへの C-BSE 感染実験の結果に照らし、また、ヒト型遺伝子改変マウスへの H-BSE プリオンの伝播効率が低いという他の研究グループの報告も踏まえると、畜産物等を介する H-BSE プリオンのヒトへの感染リスクは C-BSE プリオンよりも低いのではないかと推測される。

2) 研究班が所有するウシ由来 BSE プリオンやカニクイザル馴化 BSE プリオンが持続的に感染する培養細

胞の開発を進めた。細胞株のスクリーニング (R3 年度に実施) を経て、カニクイザル馴化 BSE プリオンが持続感染する細胞を作出することができた。しかし、この細胞の本来の特性として、外来プラスミドのリポフェクション効率がやや低い。この点は、今後、工夫・改良する余地がある。BSE プリオンについての研究、とりわけヒト *PRNP* のさまざまな多型の違いと BSE プリオンの感染リスクの相関、の探索に活用できることを目指し、さらに検討を加えたい。

#### E. 結論

以下の結論を得た。

- H-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播効率は C-および L-BSE プリオンよりも低いことがわかった。H-BSE プリオンのヒトへの感染リスク評価は慎重であるべきだが、変異型 CJD モデルとしてのカニクイザルへの C-BSE 感染実験の結果に照らすと、畜産物等を介する H-BSE プリオンのヒトへの感染リスクは C-BSE プリオンよりも低いのではないかと推測された。
- サル馴化 C-BSE プリオンが持続感染できる培養細胞を開発した。サル C-BSE プリオンだけでなくサル L-BSE プリオンが持続感染できるかどうかという点、また、このノックアウト細胞にウシ PrP<sup>C</sup> を発現させてウシ BSE プリオンを持続感染させることができるかどうかという点を、今後検討していきたい。

#### 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

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

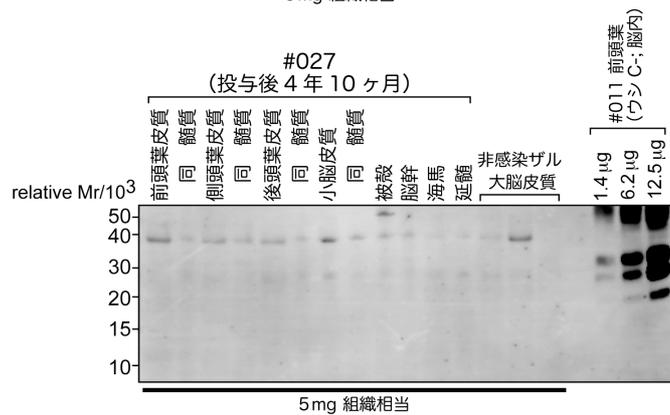
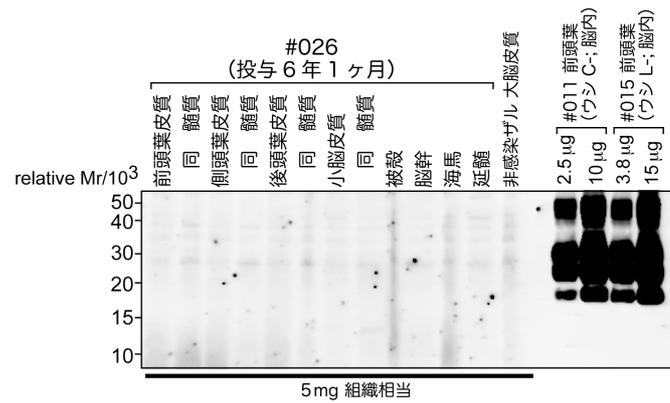
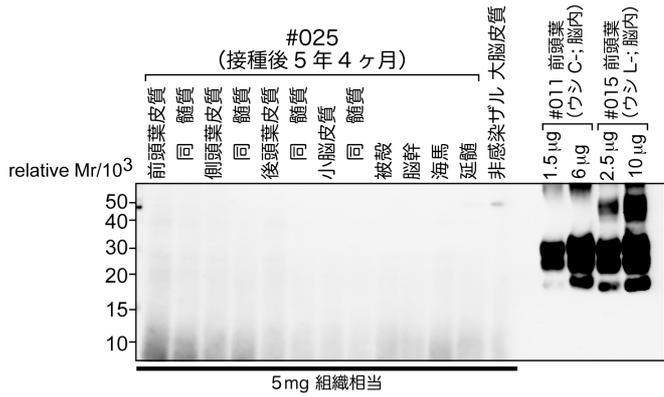
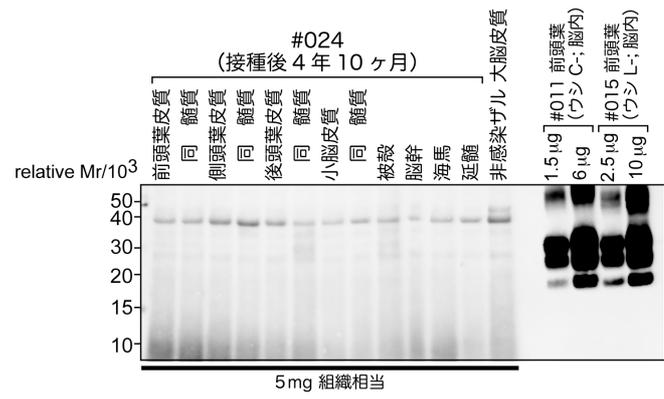


図1 #024、025、026、027 の脳の PrP<sup>Sc</sup> の検出(3F4 抗体による)

表1 H-BSE プリオンを脳内接種／経口投与したカニクイザルのウエスタンブロット分析の結果

	個体 No	024	025	026	027
	プリオン	H-, 脳内接種		H-, 経口投与	
	観察期間	4年10ヵ月	5年4ヵ月	6年1ヵ月	4年10ヵ月
脳	前頭葉	-	-	-	-
	側頭葉	-	-	-	-
	後頭葉	-	-	-	-
	視床・脳幹	-	-	-	-
	海馬	-	-	-	-
	被殻	-	-	-	-
	小脳	-	-	-	-
	延髄	-	-	-	-
脳以外の 神経系	視神経	-	-	*	*
	眼球	-	-	*	*
	脊髄頸部	-	-	*	*
	脊髄胸部	-	-	*	*
	脊髄腰部	-	-	*	*
	正中神経	*	*	*	*
	坐骨神経	-	-	*	*
リンパ組織	脾臓	-	-	-	-
	扁桃	-	-	-	-
	回腸	*	*	-	-
	腸間膜リンパ	*	*	-	-
	顎下腺	-	-	-	-
	下顎リンパ	-	-	§	§
	腋下リンパ	*	*	-	-
	鼠径リンパ	*	*	-	-
	鼻腔粘膜	-	-	-	-
	胸腺	*	*	-	-

\*: R4 年度時点で未分析。

(脳内接種および経口投与ルートから予想されるプリオンの伝播・拡散経路から、分析する組織の優先順位を決めた。未分析の組織については、順次分析を進める予定。)

§: 少量のためホモジナイズ不能。

表2 研究に供した全カニクイザルの *Prnp* 塩基配列の分析結果<sup>¶</sup>

個体 No	実験	<i>Prnp</i>	アミノ酸配列の変異
007	C-BSE プリオン 初代 ic(ウシ→サル)	Y145=TAT/TAC、Y163=TAT/TAC、-121 塩基(イントロン領域)=G/A	無
010	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000062847 に一致	無
011	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000062847 に一致	無
016	C-BSE プリオン 2代目 ic(サル→サル)	-132 塩基(イントロン領域)=T/T (§)	無
017	同上	P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC、T192=ACT/ACC	無
020	C-BSE プリオン 3代目 ic(サル→サル→サル)	-121 塩基(イントロン領域)=G/A、-25 塩基(イントロン領域)=T/C (§)	無
021	同上	-25 塩基(イントロン領域)=T/C (§)	無
014	L-BSE プリオン 初代 ic(ウシ→サル)	Ensemble データベース ENSMMUG00000062847 に一致	無
015	同上	P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC、T192=ACT/ACC	無
022	L-BSE プリオン 2代目 ic(サル→サル)	Ensemble データベース ENSMMUG00000062847 に一致	無
023	同上	P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC、T192=ACT/ACC	無
018	L-BSE プリオン 初代 po(ウシ→サル)	Ensemble データベース ENSMMUG00000062847 に一致	無
019	同上	Ensemble データベース ENSMMUG00000062847 に一致	無
024	H-BSE プリオン 初代 ic(ウシ→サル)	D202=GAT/GAT	無
025	同上	-132 塩基(イントロン領域)=T/T (§)	無
026	H-BSE プリオン 初代 po(ウシ→サル)	対立遺伝子の1つにおいて、NcoI サイト近傍のオクタペプチド配列が1リピート欠失している [同配列が反復しているため、欠失の開始部位・終了部位の特定はできない (元の配列が ABCDABCDABCD だとして、例えば ABCD が欠失しても BCDA が欠失しても、欠失後の配列は ABCDABCD になる)]。	欠失有
027	同上	-121 塩基(イントロン領域)=G/A (§)	無
032	L-BSE プリオン 2代目 po(サル→サル) /kuru モデル	-25 塩基(イントロン領域)=T/C (§)	無
033	同上	-121 塩基(イントロン領域)=G/A、P39=CCA/CCG、C179=TGT/TGC、T192=ACT/ACC	無
034	L-BSE プリオン 2代目 ic(サル→サル) /感染初期の経過追跡	Y145=TAT/TAC、Y163=TAT/TAC	無
035	同上	28 番目アミノ酸が、P(CCT)と T(ACT)のヘテロ接合体(←データベースは CCT)	有

§: 塩基置換はイントロン領域のみ。PrP コード領域は ENSMMUG00000062847 に一致。

¶: R 元年以前の研究班にて実施した個体、および R5 年度以降の研究班で実験開始する個体を含む。

## 6. 異種間交差伝達によるプリオンの性状変化及びプリオン株に依存したニューロンの選択的傷害に関する研究

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学 獣医学研究部門 教授

### 研究要旨

BSE プリオンが牛以外の異なる動物種に伝達された後、再び牛に伝達されたことにより生じるプリオン株の性状について、げっ歯類による異種間伝達実験を行い検討した。C-BSE プリオンマウス馴化株 (C-BSE/Ms 株) を異種動物であるハムスター (Hm) に伝達し、その感染脳をマウス (Ms) に再度伝達し、伝達モデルを作製した (C-BSE/Ms/Hm/Ms)。スナネズミ (Gb) についても同様に C-BSE/Gb, C-BSE/Gb/Hm/Gb を作製した。モルモット (GP) について C-BSE/GP, C-BSE/Ms/GP, C-BSE/Gb/GP, C-BSE/Ms/Hm/GP, C-BSE/Gb/Hm/GP を、ハムスターについても L-BSE/Hm, C-BSE/Ms/Hm, C-BSE/Gb/Hm, C-BSE/GP/Hm を作製した。感染動物の脳組織について、病理学的解析として lesion profile と PrP<sup>res</sup> の沈着パターンを、生化学的解析としてウェスタンブロットによる PrP<sup>res</sup> の分子量と糖鎖の修飾割合を評価した。C-BSE/Ms と C-BSE/Ms/Hm/Ms では、脳の病変分布および PrP<sup>res</sup> の分子量に違いは認められなかったが、PrP<sup>res</sup> の沈着パターンおよび糖鎖の修飾割合に変化を認めた。C-BSE/Gb と C-BSE/Gb/Hm/Gb では、生化学的な違いは認められなかったが病理学的には異なっていた。C-BSE プリオンを、異なる動物種を介して伝達したモルモットおよびハムスターについて同種動物間で比較すると、病理学的にも生化学的にも異なる特徴を示した。C-BSE プリオンをマウスあるいはスナネズミに伝達し、異種動物であるハムスターを介して再び元の動物種に伝達すると表現型が変化した。また、起源の同じプリオン株を、異なる動物種を介して伝達した同種動物の表現型はいずれも異なったことから、BSE プリオンを異なる動物種を介すると伝達された同種動物に異なるプリオン株が容易に生じることが明らかになった。

### A. 研究目的

プリオンを異種動物に伝達する際には、伝達可能な動物種の制限や潜伏期間の延長、伝達割合の低下などが生じる。これは感染源である PrP<sup>res</sup> およびプリオンが伝達された動物の PrP<sup>c</sup> のアミノ酸配列の相同性に起因する「種の壁」と PrP<sup>res</sup> の立体構造のわずかな差異、安定性や変換速度などのプリオン株の性質に起因する「株の壁」によるとされている。これまでの研究で、本邦で発生した L-BSE プリオンはハムスターへの伝達性は確認されたが、モルモットへの伝達性は認められなかった。一方、C-BSE プリオンはモルモットへ伝達性を示したが、ハムスターへの伝達性は認められなかった。

本研究では BSE プリオンが牛以外の異なる動物種に伝達された後、再び牛に伝達されたことにより新しいプリオン株が生じる可能性について、げっ歯類による異種間伝達実験を行い検証した。本実験では、それぞれ伝達性を示した動物種から、初代では伝達性を示さなかった動物種を含む異

なる動物種へ伝達を行った。さらに、伝達性が成立した場合には、動物種をもとの動物種に戻して次代へさらに感染実験を行った。その中で見られたプリオン伝達動物の病理学的特徴および生化学的特徴をプリオン株と動物種の観点から比較し、異種間伝達によるプリオン株の表現型の変化を評価した。

### B. 研究方法

#### 1) 供試動物及び接種材料

マウス (Jcl/ICR), スナネズミ (MGS/Sea), モルモット (Slc/Hartley), ハムスター (Slc/Syrian) を使用した。C-BSE(BSE/JP4)プリオン株をマウスに接種したものを C-BSE プリオン伝達マウス (C-BSE/Ms) とし、それをハムスターに伝達した C-BSE マウス株伝達ハムスター (C-BSE/Ms/Hm), さらにそれをマウスに接種したものを C-BSE マウスハムスター株伝達マウス (C-BSE/Ms/Hm/Ms) とした。同様にして C-BSE をスナネズミ, ハムスター, スナネズミと順に伝達したものをそれぞれ

C-BSE プリオン伝達スナネズミ (C-BSE/Gb), C-BSE スナネズミ株伝達ハムスター (C-BSE/Gb/Hm), C-BSE スナネズミハムスター株伝達スナネズミ (C-BSE/Gb/Hm/Gb) とした。C-BSE プリオンを、異なる動物種を介して伝達したモルモットについて同種動物間で比較するために、C-BSE プリオン接種モルモット (C-BSE/GP) を対照に同様に C-BSE/Ms/GP, C-BSE/Ms/Hm/GP, C-BSE/Gb/GP, C-BSE/Gb/Hm/GP とした。ハムスターについても、L-BSE 感染牛 (BSE/JP24) 由来の L-BSE プリオン株を接種したハムスター (L-BSE/Hm) を対照として C-BSE/Ms/Hm, C-BSE/Gb/Hm とした。Fig.1 に実験の概要を示した。

## 2) 病理学的検査

接種動物は病末期にイソフルラン麻酔下で安楽殺し、解剖および採材を行った。

脳を 10% 中性緩衝ホルマリンで 1 週間の固定後、切り出し、再固定を 48 時間行った。次に、98% ギ酸に 1 時間浸漬し、プリオン不活化処理を行った。その後、脱水、パラフィン包埋を実施し、定法に従い 4  $\mu$ m パラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。脳の各部位の空胞変性程度をスコアリングし、病変分布 (lesion profile) を作製した。

免疫組織学的検索では、一次抗体として B103 抗体, 110 抗体, 12F10 抗体を用い、常法に従い実施した。PrP<sup>res</sup> の沈着程度は軽度, 中等度, 重度に分類した。

## 3) WB 検査

採材した脳で 2.5% 脳乳剤を作製した。続いて同量の Detergent buffer と混和し 2-butanol, collagenase を加え 37°C で 30 分消化した。続いて PK を加え 37°C で 30 分消化した。SDS サンプルバッファーを加え、煮沸後試料調製した。常法に従い電気泳動, PVDF 膜への転写, T2 抗体による反応後、シグナルを検出した。取得した画像は ImageJ で解析を行った。PrP<sup>res</sup> の糖鎖の修飾割合については、各 3 検体を用いて T 検定を行った。

(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, 肉眼所見および発症日数

C-BSE/Ms/Hm 株, C-BSE/Gb/Hm 株はそれぞれマウス, スナネズミに伝達性を示し、各 3 匹中 3 匹で被毛粗剛や沈鬱, 歩様異常などの症状がみられた。C-BSE/GP/Hm 株のモルモットへの伝達性は確認されなかった。プリオン接種動物の病末期までの平均日数は Table2 に示した。

### 2) 組織学的・免疫組織化学的検索

BSE プリオン伝達動物の Lesion profile および免疫染色の結果については Figure3 および Figure4 で示した。

#### a) マウス

C-BSE/Ms では、大脳, 間脳, 小脳, 脳幹部神経網や神経細胞質内に空胞変性が確認された。病変の程度は脳幹部で顕著にみられた。免疫染色では、微細顆粒状やプラーク状, びまん性の PrP<sup>res</sup> の沈着が確認された。PrP<sup>res</sup> の沈着の程度は、海馬, 延髄, 中脳, 視床下部で重度, 大脳皮質, 梁下野, 視床では中等度を示した。C-BSE/Ms/Hm/Ms の Lesion profile は C-BSE/Ms とほぼ同様であった (Fig.2-1)。免疫染色では、病変に一致してプラーク状または微細顆粒状の PrP<sup>res</sup> 沈着が確認された。大脳の皮質軟膜下には線状の PrP<sup>res</sup> 沈着が軽度に、海馬, 間脳, 延髄で中等度を示した (Fig.2-2)。

#### b) スナネズミ

C-BSE/Gb では、大脳, 間脳, 脳幹部, 特に間脳, 梁下野において空胞が顕著であった (Fig.3-1)。免疫染色では、大脳, 間脳に微細顆粒状やびまん性, 小脳にプラーク状沈着が確認された。C-BSE/Gb/Hm/Gb では、大脳, 間脳, 脳幹部に空胞変性が確認された。海馬の病変は軽度であった。免疫染色では、大脳, 間脳にプラーク状, 微細顆粒状やびまん性の PrP<sup>res</sup> の沈着が確認された (Fig.3-2)。

#### c) モルモット

C-BSE/GP では、大脳, 間脳, 小脳, 脳幹部, 特に視床と海馬に強い空胞変性がみられた。小脳では顆粒層の減数と分子層の菲薄化と、それによる小脳の萎縮が顕著であった。免疫染色では、同部位にプラーク状や微細顆粒状, 放射状, びまん性, PrP<sup>res</sup> 沈着がみられ、その程度は視床, 延髄で重度, 大脳皮質は軽度だった。C-BSE/Ms/GP では、空胞変性の程度は大脳, 間脳において顕著であった。小脳では顆粒層の減数と分子層の菲薄化による小脳萎縮がみられた (Fig.4-1, 2)。免疫染色では、プラーク状, 微細顆粒状, 小斑状やびまん性の沈着が確認され、その程度は小脳で軽度, 大脳と間脳において重度だった。C-BSE/Ms/Hm/GP では、空胞変性の程度は大脳, 視床で顕著であった。小脳では C-BSE/GP と同様に顆粒層の減数と分子層の菲薄化が見られた。免疫染色では、同部位にプラーク状, 微細顆粒状, 小斑状, 放射状やびまん性の沈着が確認され、その程度は大脳, 視床で重度であった。C-BSE/Ms/GP と C-BSE/Ms/Hm/GP の病変分布は、程度は異なるものの類似したパターンを示し、PrP<sup>res</sup> 沈着パターンも類似していた。C-BSE/Gb/GP の空胞変性の程度は大脳, 視床におい

て顕著であった。小脳では顆粒層の減数と分子層の菲薄化による小脳萎縮がみられた。免疫染色では、プラーク状、微細顆粒状、放射状やびまん性の沈着が確認され、その程度は大脳と間脳において重度であった。C-BSE/Gb/Hm/GPの空胞変性の程度は海馬で弱く、大脳と視床で顕著であった。小脳の萎縮は確認できなかった。免疫染色ではプラーク状、微細顆粒状、びまん性の沈着が確認され、海馬、小脳では軽度、大脳（特に吻側）、間脳で重度であった(Fig.4-1, 2)。

#### d) ハムスター

L-BSE/Hmの空胞変性病変は軽度であった。免疫染色では微細顆粒状、血管や神経細胞周囲への小型斑状やびまん性の沈着が確認された。加えて、軟膜下に線状のPrP<sup>res</sup>沈着が認められた。視床下部の沈着は軽度、視床、海馬、大脳皮質は重度だった。C-BSE/Ms/Hmの空胞変性はL-BSE/Hmより明瞭で、海馬では軽度、視床で重度だった。免疫染色では、微細顆粒状や小斑状、びまん性の沈着が確認され、その程度は大脳皮質、視床下部、小脳髄質で軽度、視床や海馬、中脳で中等～重度を示した。C-BSE/Gb/Hmでは、大脳、間脳、小脳髄質、脳幹部に空胞変性が確認された(Fig.5-1)。免疫染色では、小脳皮質を除き微細顆粒状やびまん性、放射状、血管周囲への小型斑状の沈着が確認され、その程度は、大脳皮質で軽度、視床、海馬で中等～重度を示した。C-BSE/GP/Hmでは、大脳、間脳、小脳髄質、脳幹部に空胞変性が確認された。免疫染色では、同部位に加えて小脳髄質にも微細顆粒状や、放射状、血管周囲への小型斑状、びまん性の沈着が確認された。また、大脳、間脳、中脳軟膜下には線状のPrP<sup>res</sup>の沈着が認められた。沈着の程度はL-BSE/Hmと比較してやや強く、大脳、間脳、中脳、海馬において中等度、小脳で軽度を示した(Fig.5-2)。

### 3) WB 検索

#### a) マウス

C-BSE/Ms, C-BSE/Ms/Hm/MsではPK抵抗性配列を示すPrP<sup>res</sup>の分子量に差は見られなかった。PrP<sup>res</sup>の糖鎖修飾の割合は、C-BSE/Ms/Hm/MsはC-BSE/Msと比較して2糖鎖型が増加、1糖鎖型が減少し、修飾パターンの有意な変化を認めた。

#### b) スナネズミ

C-BSE/GbとC-BSE/Gb/Hm/GbではPrP<sup>res</sup>の分子量、糖鎖修飾の割合に変化はみられなかった。

#### c) モルモット

C-BSE/GPと比較すると、C-BSE/Ms/GP, C-BSE/Ms/Hm/GPはPrP<sup>res</sup>の分子量はやや減少したが、C-BSE/Ms/GPとC-BSE/Ms/Hm/GPにおいては、差は認められなかった。糖鎖の修飾割合は、

C-BSE/Ms/GPとC-BSE/GP、C-BSE/Ms/Hm/GPとC-BSE/Ms/GPでは変化を認めなかった。C-BSE/Ms/Hm/GPはC-BSE/Ms/GPと比較して2糖鎖型および1糖鎖型PrP<sup>res</sup>の割合が有意に減少していた。C-BSE/GP, C-BSE/Gb/GP, C-BSE/Gb/Hm/GPではPrP<sup>res</sup>の分子量の違いは見られなかった。糖鎖の修飾割合についてC-BSE/Gb/GPはC-BSE/GPと比較し2糖鎖型PrP<sup>res</sup>の減少と1糖鎖型の増加、C-BSE/Gb/Hm/GPはC-BSE/GPと比較して2糖鎖型の減少、1糖鎖型の増加が有意に認められた。C-BSE/Ms/Hm/GPはC-BSE/Ms/GPと比較して、2糖鎖型および1糖鎖型のPrP<sup>res</sup>の割合が有意に減少した。

#### d) ハムスター

L-BSE/Hm, L-BSE/Ms/Hm, L-BSE/Gb/Hm, L-BSE/GP/HmにおいてPrP<sup>res</sup>はそれぞれ異なる分子量を示した。糖鎖の修飾割合はL-BSE/Hmと比較して、C-BSE/Ms/HmおよびC-BSE/GP/Hmでは2糖鎖型、1糖鎖型、無糖鎖型の割合が、C-BSE/Gb/Hmでは2糖鎖型、1糖鎖型の割合が有意に変化していた。C-BSE/Ms/HmとC-BSE/Gb/HmおよびC-BSE/Gb/HmとC-BSE/GP/Hmの2糖鎖型の割合に有意差を認めた。

## D. 考察

本研究では最初に、異種動物にプリオンを伝達したのち、もう一度元の動物にプリオンを伝達することで病理学的、生化学的にどのような変化が生じるかを検証した。マウスであるC-BSE/MsとC-BSE/Ms/Hm/Msでは、脳の空胞変性の病変分布、PrP<sup>res</sup>の分子量の違いは認められなかったが、PrP<sup>res</sup>の沈着パターン、糖鎖の修飾割合に変化を認めた。スナネズミであるC-BSE/GbとC-BSE/Gb/Hm/GbではPrP<sup>res</sup>の分子量および糖鎖の修飾割合では違いは認められなかったが、脳の病変分布、PrP<sup>res</sup>の沈着パターンでは異なる性質を示した。C-BSEプリオンを起源とし、異なる動物種であるハムスターを介して再び元の動物種に伝達すると、元の動物種でみられた表現型とは変化することが明らかになった。この結果を直接牛に外挿することはできないが、あえて言えば牛間で継代されていたC-BSEあるいはL-BSEプリオンが、羊や山羊といった異種動物を介して再び牛に伝達された場合、元のプリオン株とは異なる性質を示す新しいプリオン株が出現することを意味する。

次に、C-BSEプリオンを様々な動物で継代したのちにモルモットあるいはハムスターに伝達し、それぞれモルモットあるいはハムスター間で比較することで、起源を同じくするプリオン株の性状変化について検証した。モルモットでは、C-

BSE/Ms/GP と C-BSE/Ms/Hm/GP の病変分布や PrP<sup>res</sup> の沈着パターンは類似していたが、PrP<sup>res</sup> の糖鎖修飾の割合に違いを認めた。C-BSE/Ms/GP および C-BSE/Ms/Hm/GP は C-BSE/GP とは PrP<sup>res</sup> の糖鎖の修飾割合に違いを認めなかったが、異なる分子量および病理組織学的特徴を示した。また、C-BSE/GP, C-BSE/Gb/GP, C-BSE/Gb/Hm/GP の病変分布および PrP<sup>res</sup> の沈着パターンはそれぞれ異なっていた。これらについて PrP<sup>res</sup> の分子量には違いは認められなかったものの、糖鎖の修飾割合は異なる結果を示した。ハムスターでは、C-BSE/Ms/Hm, C-BSE/Gb/Hm および C-BSE/GP/Hm は病変分布が類似していたが、分子量および糖鎖の修飾割合は異なり、さらにいずれも L-BSE/Hm とは異なっていた。このことから、起源の同じ BSE プリオンがマウス、スナネズミ、ハムスターといった異なる動物種を介することで、プリオン株の性状が変化、同一動物種でも異なる株として新たな表現型が生じることが確認できた。

BASE 発症牛由来の PrP<sup>res</sup> をマウスに伝達した研究では、マウスでの継代により病理学的特徴および PrP<sup>res</sup> の生化学的特徴が BASE 伝達マウスと C-BSE 伝達マウスで区別し難くなったことが報告されている。本研究で比較に用いた動物はいずれも異種動物由来の脳乳剤を接種した初代動物であることから、今回得られたプリオン株をそれぞれ同種動物で継代していくことによる変化を、一つのプリオン株に収束していく可能性も含めて検討することが必要と考えられた。継代によりプリオン株の表現型がどう変化していくのか

検討することは、牛のプリオン病が現状では C-BSE あるいは L-, H-BSE の 3 型であることを説明するかもしれない。

#### E. 結論

C-BSE プリオンを異なる動物種を介して、元の動物種に戻し伝達すると以前のプリオン株とは異なる新しいプリオン株が容易に生じることが示された。また、C-BSE プリオンは異なる動物種を介することで同一動物種に異なる表現型を生じさせた。

#### 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

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

Fig. 1. BSE プリオンの異種間伝達実験の概要

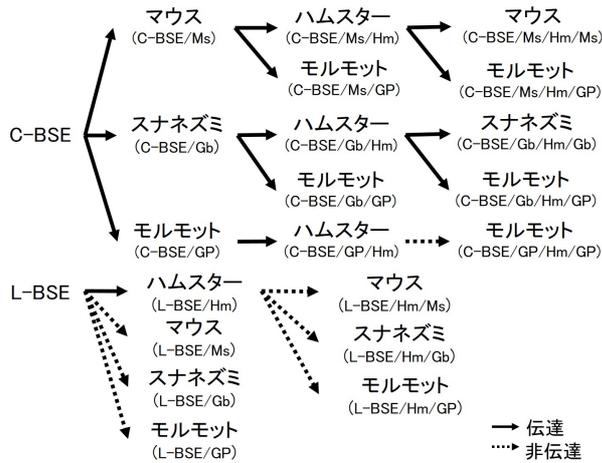
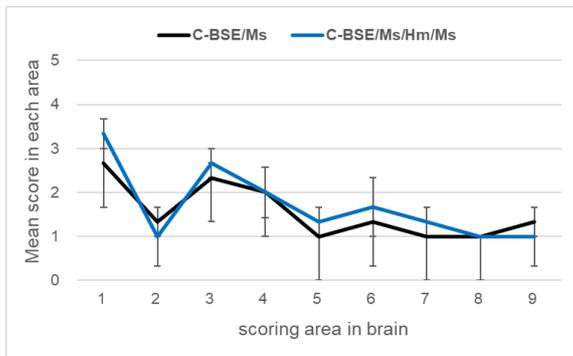


Fig. 2-1. マウス Lesion profile



1. dorsal medulla; 2. cerebellum; 3. midbrain; 4. hypothalamus; 5. thalamus; 6. hippocampus; 7. septal nuclei of the paraterminal body; 8. caudal cerebral cortex; 9. rostral cerebral cortex.

Fig. 3-1. スナネズミ Lesion profile

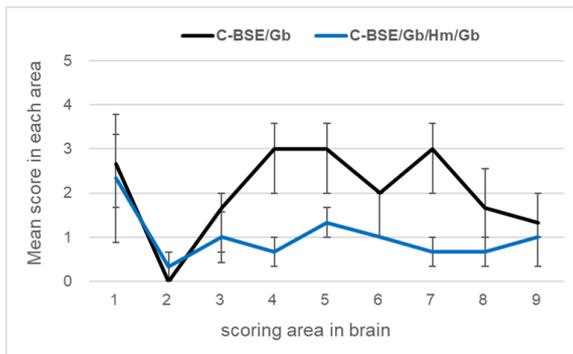


Fig. 2-2. マウスミ免疫染色

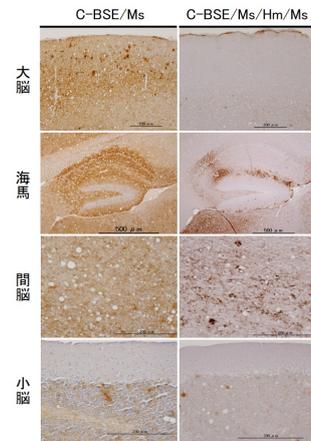


Fig. 3-2. スナネズミ免疫染色

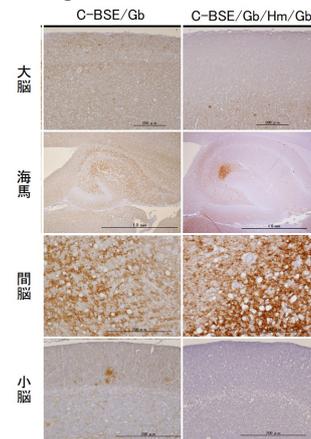


Fig. 4-1. モルモット Lesion profile

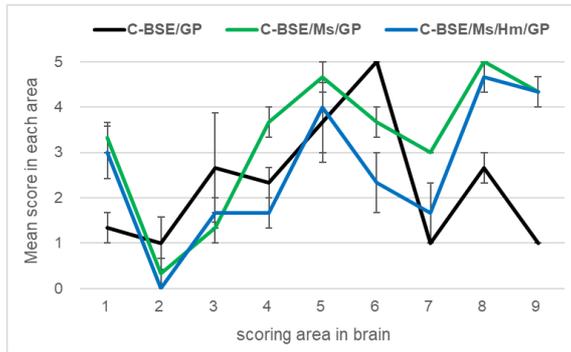


Fig. 4-2. モルモット Lesion profile

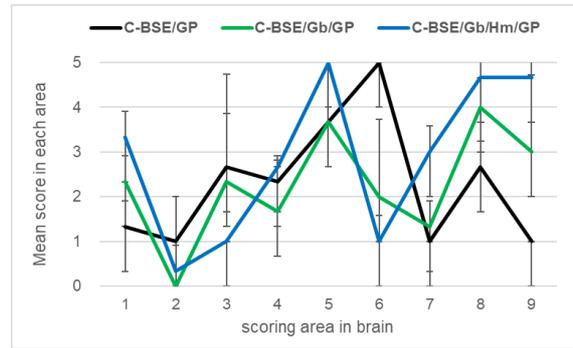


Fig.4-3. モルモット免疫染色

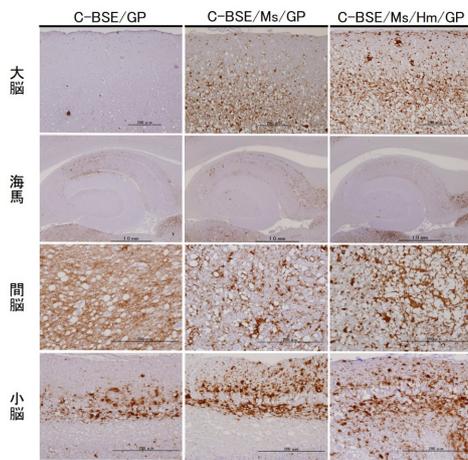


Fig.4-4. モルモット免疫染色

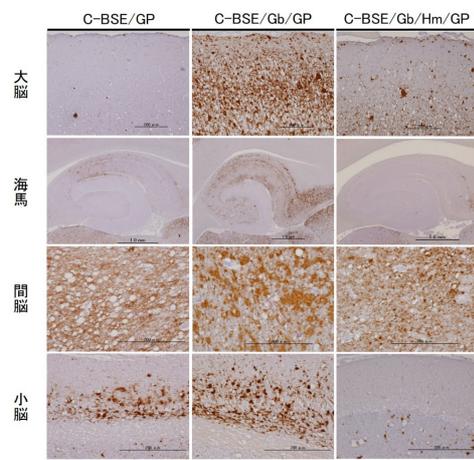


Fig. 5-1. ハムスター Lesion profile

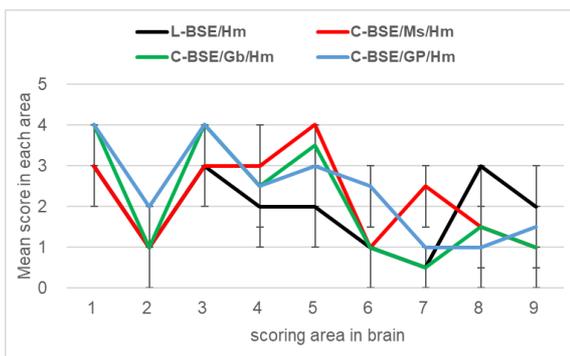


Fig.5-2. ハムスター免疫染色

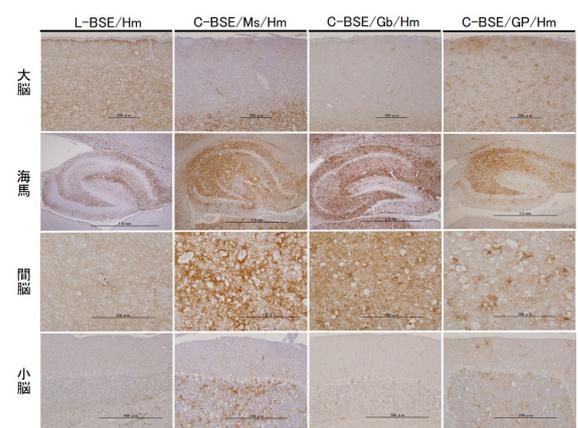
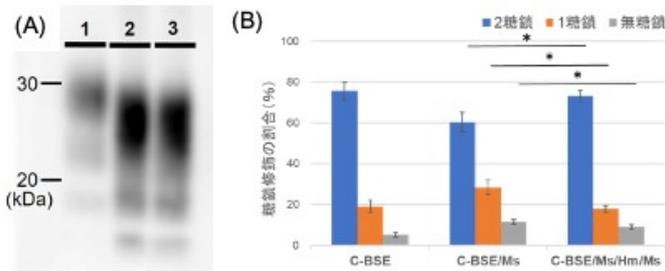
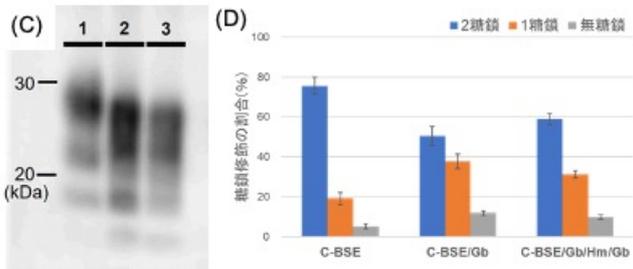


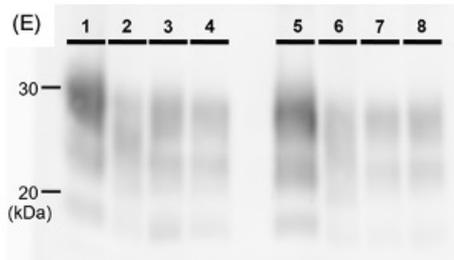
Fig.6. WBによる生化学的解析



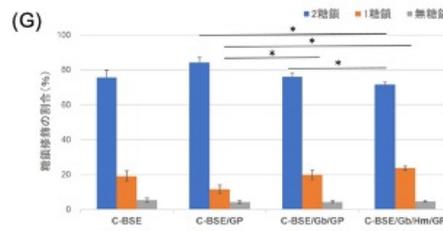
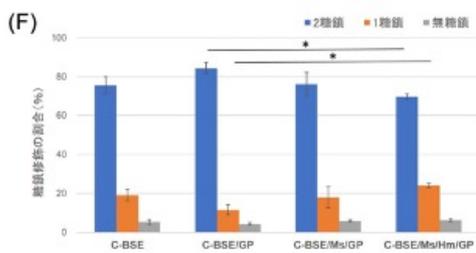
(A) Lane 1: C-BSE 感染牛 (BSE/JP6); lane 2: C-BSE/Ms; lane 3: C-BSE/Ms/Hm/Ms  
 (B) PK 抵抗性配列を示す PrP<sup>res</sup> の糖鎖修飾の割合。結果は3検体の平均値, エラーバーは標準誤差。\* : P 値 < 0.05



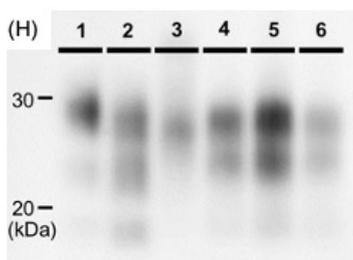
(C) Lane 1: C-BSE 感染牛 (BSE/JP6); lane 2: C-BSE/Gb; lane 3: C-BSE/Gb/Hm/Gb  
 (D) PK 抵抗性配列を示す PrP<sup>res</sup> の糖鎖修飾の割合。結果は3検体の平均値, エラーバーは標準誤差。\* : P 値 < 0.05



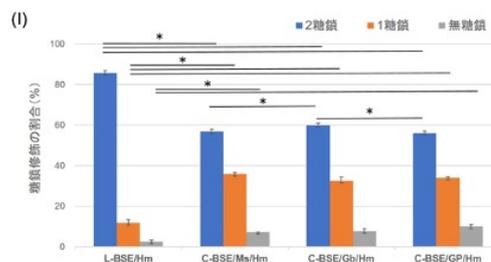
(E) Lane 1: C-BSE 感染牛 (BSE/JP6); lane 2: C-BSE/GP; lane 3: C-BSE/Ms/GP; Lane 4: C-BSE/Ms/Hm/GP;  
 Lane 5: C-BSE 感染牛 (BSE/JP6); Lane6: C-BSE/GP; Lane7: C-BSE/Gb/GP; Lane8: C-BSE/Gb/Hm/GP



(F, G) PK 抵抗性配列を示す PrP<sup>res</sup> の糖鎖修飾の割合。結果は3検体の平均値, エラーバーは標準誤差。\* : P 値 < 0.05



(H) Lane 1: C-BSE 感染牛 (BSE/JP6); lane 2: L-BSE (BSE/JP24); lane 3: L-BSE/Hm; Lane 4: C-BSE/Ms/Hm; Lane 5: C-BSE/Gb/Hm; Lane 6: C-BSE/GP/Hm



(I) PK 抵抗性配列を示す PrP<sup>res</sup> の糖鎖修飾の割合。結果は3検体の平均値, エラーバーは標準誤差。\* : P 値 < 0.05

## 7. PMCA 法による L-BSE 実験経口感染牛におけるプリオン体内分布の解析およびヒト型プリオンタンパク質遺伝子発現マウスを用いた動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

分担研究者 宮澤 光太郎 農研機構動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域  
新興ウイルスグループ グループ長補佐

研究協力者 岩丸 祥史 (農研機構動物衛生研究部門 動物感染症研究領域)

松浦 裕一 (農研機構動物衛生研究部門・動物感染症研究領域)

池田 圭吾 (農研機構動物衛生研究部門・動物感染症研究領域)

### 研究要旨

本研究では、第一に L-BSE プリオンのウシ間での経口伝播リスクを検証した。第二にヒトプリオン蛋白質過発現マウス (TgHu129M) モデルを用いて動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクを推定した。第三に、ウシプリオンタンパク質過発現マウス (TgBoPrP) モデルを用いて非定型スクレイピープリオンのウシへの伝達リスクを推定し、異種間伝達による C-BSE プリオンの出現の可能性を検証した。その結果、①L-BSE プリオンはウシ間で経口伝達可能であるが、そのリスクは極めて小さいこと、②TgHu129M モデルにより、非定型スクレイピー等の動物由来プリオンがヒトへ伝達する可能性は極めて低いこと、③TgBoPrP モデルにより、非定型スクレイピープリオンのウシへ伝達リスクや C-BSE プリオンが出現する可能性は極めて低いことを示した。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は、病態および異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の生化学的性状の違いにより、定型 (C-BSE) と非定型 (L-および H-BSE) に分類される。C-BSE プリオンは、肉骨粉等の飼料を介してウシ間で経口伝播するが、非定型 BSE プリオンが経口伝播するかは不明であった。ウシを用いた実験感染の結果から、我々は H-BSE プリオンが経口伝播しないのに対し、L-BSE プリオンは経口伝播することを強く示唆する結果を得た。加えて、ウシへの L-BSE プリオン脳内接種試験では、可食部である筋組織から高感度プリオン検出法 (PMCA 法) により PrP<sup>Sc</sup> が検出されていることから、本課題では、L-BSE プリオンがウシ間で経口伝播することを証明し、その PrP<sup>Sc</sup> 組織分布を解析することを第一の目的とする。一方、北米・欧州ではシカのプリオン病である慢性消耗病 (CWD) の感染地域が年々拡大し、大きな問題となっているが、ヒトへの伝達リスクは未だ不明である。加えて、ヒツジおよびヤギのプリオン病で

あるスクレイピーのヒトへの伝達を示唆する実験結果も報告されており、動物由来プリオンのヒトへの伝達リスク評価は公衆衛生上極めて重要である。そこで、ヒトプリオン蛋白質過発現マウス (TgHu129M) を用いて国内外で摘発されたスクレイピー (非定型スクレイピーを含む) と北米由来の CWD の伝達試験を実施し、ヒトへの伝達リスクを推察することを第二の目的とする。2019 年に、我々が使用するウシプリオンタンパク質過発現マウス (TgBoPrP) とは異なる系統のトランスジェニックマウス (Tg110) モデルにより、非定型スクレイピープリオンの Tg110 マウスへの異種間伝達による従来型 BSE (C-BSE) プリオンの出現が報告された。そこで、我が国で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー野外例を TgBoPrP マウスに接種し、ウシへの伝達リスクの推定と異種間伝達による C-BSE プリオンの出現の可能性を検証した。

### B. 研究方法

1) 超高感度検出法を用いた L-BSE 感染ウシ脳乳剤経口投与 153 ヶ月後のウシ組織における異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の蓄積評価

50 グラムの L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与 153 ヶ月後のウシ (#9383) の中枢神経系、末梢神経系および回腸パイエル板における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を超高感度プリオン検出法である PMCA を用いて評価する。

2) 非定型スクレイピー発症ヒツジまたはヤギ脳乳剤を脳内接種した TgHu129M マウスおよび CWD 感染シカの乳剤を脳内接種した TgHu129M マウスにおける PrP<sup>Sc</sup> の蓄積評価

国内で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例)、または、米国由来の CWD 感染オジロジカ脳乳剤 (6 症例) の 5 または 10% 脳乳剤 (20 μL) を TgHu129M マウスの脳に接種し、行動異常や削瘦等のプリオン病に特徴的な神経症状を示すかを最長 800 日間観察する。経過観察後、脳および脾臓等のリンパ組織を採取し、ウェスタンブロット (WB) 法と免疫組織化学染色 (IHC) により PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を調べる。

3) 国内で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例) の 5% 脳乳剤 (20 μL) を TgBoPrP マウスの脳に接種し、行動異常や削瘦等のプリオン病に特徴的な神経症状を示すかを最長 800 日間観察する。経過観察後、脳を採取し、エピトープの異なる 2 種類の抗 PrP 抗体 (P4 と 6H4) を用いた WB 法により PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を検証した。また、免疫組織化学染色 (IHC) によっても PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を検証した。ヒツジおよびヤギからウシへの異種間伝達による C-BSE プリオンの出現を検証するため、C-BSE を効率的に増幅する条件下で PMCA を実施し、非定型スクレイピー発症脳乳剤を接種した TgBoPrP マウスの脳内に C-BSE 様プリオンが存在するかを検証した。

#### (倫理面への配慮)

本実験におけるプリオンの取扱いは、(国研) 農研機構動物衛生研究部門のバイオセーフティ委員会にて承認されている。また、本実験は、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)」を遵守している。ウシおよび遺伝子改変マウスを用いた動物感染実験は、農研機構の動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会にて承認されており、

「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)」を遵守して実施する。

#### C. 研究結果

1) 超高感度検出法を用いた L-BSE 感染ウシ脳乳剤経口投与 153 ヶ月後のウシ組織における異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の蓄積評価

前年度の報告にあるとおり、WB 法では当該ウシ (#9383) の中枢神経系からは PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。そこで、本年度は超高感度プリオン検出法である PMCA を用いて中枢神経系およびプリオン経口伝達への関与が考えられる末梢組織での PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を調べたが、延髄門部、脊髄頸膨大および脊髄腰膨大からは PrP<sup>Sc</sup> は検出できなかった。また、頸部迷走神経、星状神経節、前腸間膜神経節、腰部交感神経幹および回腸パイエル板からも PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった (表 1)。

2) TgHu129M マウスモデルによる非定型スクレイピーおよび CWD プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

我が国で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例)、または米国由来の CWD 感染オジロジカ脳乳剤 (6 症例) を TgHu129M マウスに脳内接種し、最長 800 日間観察したが、神経症状を呈するマウスは観察されなかった。また、脳組織の病理切片を作製し HE 染色を実施したが、顕著な空胞化や神経細胞の脱落は観察されなかった。一方、IHC 法および WB 法を用いて PrP<sup>Sc</sup> の検出を試みたが、脳組織から PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった (図 1)。

3) 非定型スクレイピープリオンのヒツジ・ウシ間の異種間伝達による従来型 BSE (C-BSE) プリオンの出現の検証

我が国で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤 (各 1 症例) を TgBoPrP マウスに脳内接種し、最長 800 日間観察したが、神経症状を呈するマウスは観察されなかった。ウシプリオンタンパク質 N 末端側 (98-107 番目のアミノ酸) をエピトープとする P4 抗体を用いた WB 法では PrP<sup>Sc</sup> を検出できなかった。また、プリオンタンパク質の中央付近である 155-163 番目のアミノ酸をエピトープとする 6H4 抗体を用いても PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった (図 2)。極微量の C-BSE 様プリオンが非定型スクレイピー発症脳乳剤を接種した TgBoPrP マウスの脳内に蓄積している

かを調べるため、C-BSE プリオンを効率的に増幅する条件下において PMCA を実施したが、PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。また、TgBoPrP マウスへの接種に使用した非定型スクレイピー発症ヒツジおよびヤギ脳乳剤中からも C-BSE 様プリオンは検出されなかった (図 3)。

#### D. 考察

1) の結果から、50 グラムの L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与 153 ヶ月後に解剖したウシ(#9383)では L-BSE プリオンの経口伝播は成立していなかった。50 グラムの L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与したウシ 2 頭を調べ、#6781 では脳内に PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を確認したが、#9393 では PMCA レベルにおいても PrP<sup>Sc</sup> の蓄積は認められなかったことから、2 頭中 1 頭のみで経口伝播が成立する結果となった。この結果は、ウシ間における経口伝播には多量の L-BSE プリオンが必要であり、その伝播効率は極めて低いことを示している。

本年度は、非定型スクレイピープリオンおよび CWD プリオンのヒトへの伝達リスクについて、TgHu129M マウスモデルを用いて推定した。我が国で摘発したヒツジおよびヤギ由来の 2 株の非定型スクレイピー株を接種し、最長 800 日間の観察を実施したが、PrP<sup>Sc</sup> を蓄積する個体は認められなかった。米国から取り寄せた 6 頭のオジロジカ由来の CWD 株を接種した TgHu129M マウスについても同様に最長 800 日間の観察を実施したが、PrP<sup>Sc</sup> を蓄積する個体は認められなかった。以上の結果から、非定型スクレイピープリオンおよび CWD プリオンのヒトへの伝播には、非常強い種の壁が存在することが示唆された。

本年度は、非定型スクレイピープリオンのウシへの伝達リスクを推定するとともに、ヒツジおよびヤギからウシへの異種間伝達による従来型 BSE (C-BSE) プリオンの出現の可能性についても検証した。我が国で摘発されたヒツジおよびヤギの非定型スクレイピー発症脳乳剤を接種した TgBoPrP マウスを最長 800 日間観察したが、WB 法では、非定型スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> と C-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> のどちらも検出することはできなかった。また、C-BSE プリオンを効率的に増幅する条件下で実施した PMCA においても TgBoPrP マウスの脳からは PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。以上の結果から TgBoPrP マウスを用いた初代異種間伝達試験では、非定型スクレイピープリ

オンの伝播は確認できず、異種間伝達による C-BSE プリオンの出現も確認できなかった。一方、2019 年に外国の研究グループにより、我々が使用するウシ PrP 過発現マウスとは異なる遺伝子改変マウスを用いて非定型スクレイピープリオンから C-BSE プリオンが出現することが報告されている。現在、我々も盲継代を実施中であり、2 継代目のマウスを今後解析することによりウシへの非定型スクレイピープリオンの伝達リスクと異種間伝達による非定型スクレイピープリオンから C-BSE プリオンの出現についてより詳細な考察が可能と考えている。

#### E. 結論

ウシ間における L-BSE プリオンの経口伝播には、少なくとも 50 グラム以上の L-BSE 感染ウシ脳乳剤が必要であり、通常の飼育条件下において経口伝播が起こる可能性は極めて低いと結論づけられた。

TgHu129M マウスモデルを用いた伝播試験の結果を考慮すると、非定型スクレイピープリオンおよび北米由来の CWD プリオンのヒトへの伝播リスクは極めて小さいことが示唆された。

TgBoPrP マウスモデルを用いた伝達試験結果を考慮すると、ウシへの非定型スクレイピーの伝達リスクは極めて小さいことが示唆された。また、非定型スクレイピープリオンのウシへの異種間伝達による C-BSE プリオンの出現の可能性は我々の実験モデルからは極めて低いことが示唆された。

#### 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

- 1) Kohtarō Miyazawa, Yuichi Matsuura, Morikazu Imamura, Yoshifumi Iwamaru. Appearance of new scrapie prion strain by the conformational rearrangement of parental scrapie prion strain through serial transmission in wild-type mice, Prion2022, Vol.16 (1), 197

2) 宮澤 光太郎, 松浦 裕一, 今村 守一, 岩丸 祥史, ヒツジ由来スクレイピープリオンを野生型マウスで連続継代することで異常型プリオンタンパク質の構造変化が生じ、新たなスクレイピープリオンが出現する, 第 69 回日本ウイルス学会学術集会

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**  
なし

ウシ番号	PMCA	延髄門部	脊髄頸膨大	脊髄腰膨大	迷走神経 (頸部)	前腸間膜 神経節	星状神経節	交感神経幹 (腰部)	回腸 パイエル板	
#9383 (153ヶ月) 中枢神経系 PrP <sup>Sc</sup> 陰性	R1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	R2									
	R3									
	R4									
	R5									
	R6									
	R7									
	R8									

表 1. PMCA による#9383 の中枢神経系、末梢神経系および回腸パイエル板からの PrP<sup>Sc</sup> の検出  
NT: Not tested (R1-R4 の PMCA 産物は WB 法による PrP<sup>Sc</sup> の確認はしていない)

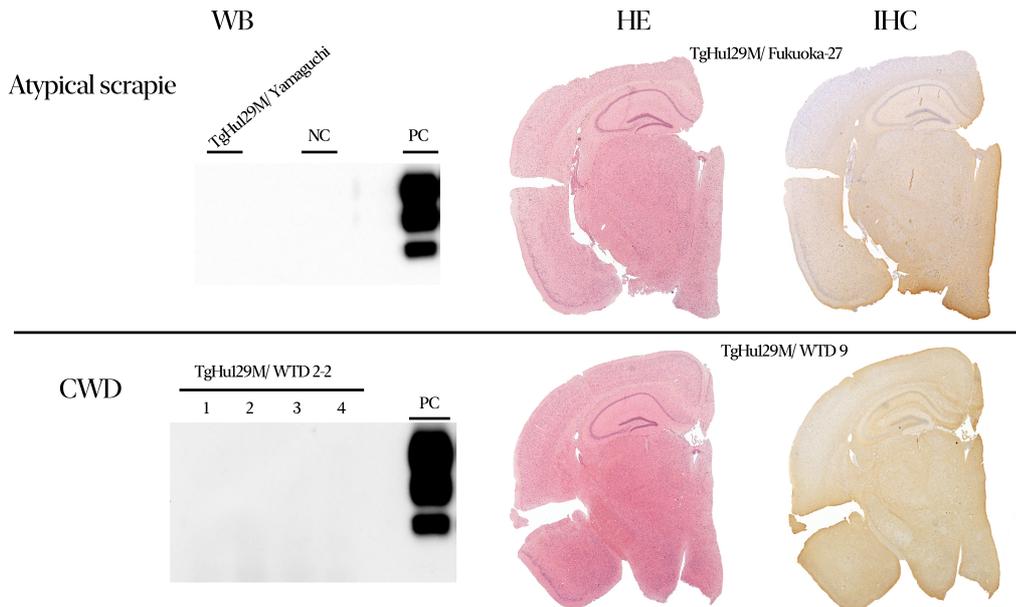


図 1. 非定型スクレイピー (Atypical scrapie) および CWD 脳乳剤接種 TgHu129M マウス脳における PrP<sup>Sc</sup> 検出結果 NC : 陰性対照, PC : 陽性対照を表す。非定型スクレイピーの Yamaguchi はヤギ、Fukuoka-27 はヒツジに由来する。CWD は全て北米のオジロジカに由来する。

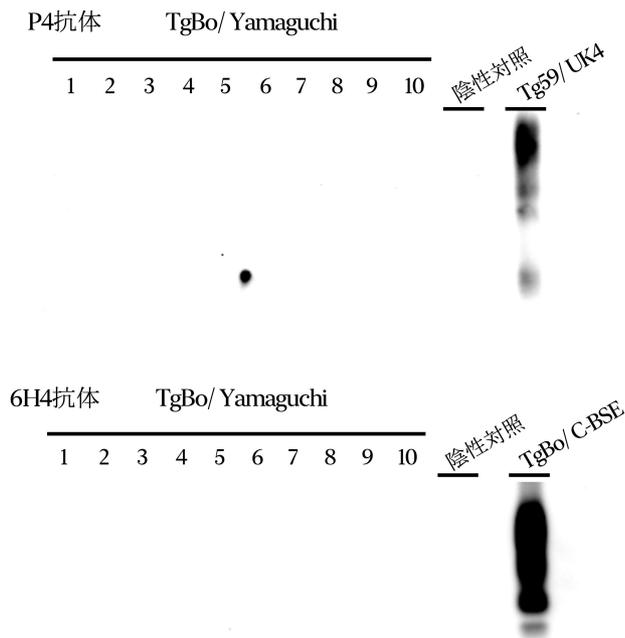


図 2. 非定型スクレイピー発症ヤギ脳乳剤を接種した TgBoPrP マウス脳における PrP<sup>Sc</sup> 検出結果  
非定型スクレイピープリオンの PrP<sup>Sc</sup> を検出可能な P4 抗体では PrP<sup>Sc</sup> は検出されない。また、C-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> を検出可能な 6H4 抗体を用いても PrP<sup>Sc</sup> は検出されない。  
P4 抗体を用いた WB の陽性対照は、英国由来の非定型スクレイピー発症ヒツジ脳乳剤を接種したヒツジ PrP 過発現 (Tg59) マウス脳 (Tg59/UK4)。  
6H4 抗体を用いた WB の陽性対照は、C-BSE 感染ウシ脳乳剤を接種した TgBoPrP マウス脳 (TgBo/C-BSE)。

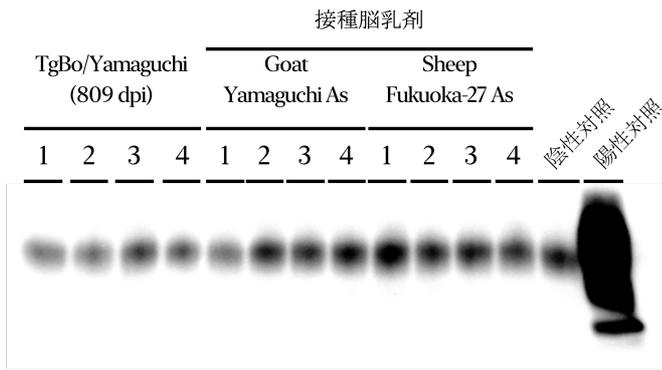


図 3. C-BSE プリオンを効率的に増幅する条件下で実施した PMCA の結果

非定型スクレイピー発症ヤギ脳乳剤を接種した TgBoPrP マウス脳 (TgBo/Yamaguchi) からは C-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> は検出されない。また、伝達試験に使用した非定型スクレイピー発症ヤギおよびヒツジの脳内からも C-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> は検出されない (Yamaguchi AS および Fukuoka-27 AS)。

### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

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
Matsuura Y, <u>Miyazawa K</u> , <u>Horiuchi M</u> , Suzuki A, Yokoyama M, Imamura M, Ikeda K, Iwamaru Y.	Extended application of the rapid post-mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease.	<i>Microbiol Immunol</i>	5	212-215	2022
Sato T, Harada K, Usui M, Yokota SI, <u>Horiuchi M</u> .	Colistin Susceptibility in Companion Animal-Derived Escherichia coli, Klebsiella spp., and Enterobacter spp. in Japan: Frequent Isolation of Colistin-Resistant Enterobacter cloacae	<i>Complex. Front Cell Infect Microbiol</i>	12	946841	2022
<u>Atarashi R</u>	RT-QuIC as ultrasensitive method for prion detection.	<i>Cell Tissue Res</i>	392(1)	295-300	2023
Pasiana AD, Miyata H, Chida J, Hara H, <u>Imamura M</u> , <u>Atarashi R</u> , Sakaguchi S.	Central residues in prion protein PrP <sup>C</sup> are crucial for its conversion into the pathogenic isoform.	<i>J Biol Chem</i>	298(9)	102381-10251	2022
Nakaya T, Yabe M, Mashalidis EH, Sato T, Yamamoto K, Hikiji Y, Katsuyama A, Shinohara M, Minato Y, Takahashi S, <u>Horiuchi M</u> , Yokota SI, Lee SY, Ichikawa S.	Synthesis of macrocyclic nucleoside antibacterials and their interactions with MraY.	<i>Nat Commun.</i>	13(1).	7575	2022

令和5年2月6日

厚生労働大臣  
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿  
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長

氏 名 寶 金 清 博

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 非定型 BSE 等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院獣医学研究院 教授  
(氏名・フリガナ) 堀内 基広 ホリウチ モトヒロ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：動物の伝達性海綿状脳症の実験指針)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 5 年 1 月 25 日

厚生労働大臣 殿

機関名 宮崎大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 鮫島 浩



次の職員の令和 4 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 非定型 BSE 等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野・教授  
(氏名・フリガナ) 新 竜一郎・アタラシ リュウイチロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年4月18日

厚生労働大臣 殿

機関名 岡山理科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 平野 博之

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 非定型 BSE 等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 獣医学部・准教授

(氏名・フリガナ) 小野 文子 ・ オノ フミコ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚労科研 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 非定型 BSE 等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究 (20KA1003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 感染病理部・客員研究員  
(氏名・フリガナ) 飛梅 実 (トビウメ ミノル)

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 非定型BSE等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 細胞化学部 主任研究官  
(氏名・フリガナ) 萩原 健一 (ハギワラ ケンイチ)

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年5月16日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人北海道国立大学機構

所属研究機関長 職名 学長

氏名 長澤 秀行

次の職員の(元号) 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 非定型 BSE 等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 獣医学研究部門・教授

(氏名・フリガナ) 古岡 秀文・フルオカ ヒデフミ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年4月12日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人  
農業・食品産業技術総合研究機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 久間 和生

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 非定型 BSE 等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 動物衛生研究部門人獣共通感染症研究領域新興ウイルスグループ・グループ長補佐  
(氏名・フリガナ) 宮澤 光太郎 (ミヤザワ コウタロウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：農水省 動物の伝達性海綿状脳症の実験指針)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	農研機構動物衛生研究部門	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---------------------------------------------------------------------

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。