

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2年度～令和4年度 総合研究報告書

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)

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2年度～令和4年度)

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	室長
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.	総合研究報告書（令和2年度～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究・・・	1
	研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
II.	研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・	12

1. 総合研究報告書

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 B S E 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 2 年度～令和 4 年度）

（20KA1003）

総合研究報告書

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 (H-および L-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。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担保する、科学技術、学術知見、および、それらを基盤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。そこで、本研究では非定型 B S E 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を推進して以下の結果を得た。

- Bu/Me によるワンステップ脂質除去法を試料前処理法に用いて、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。
- L-BSE プリオンは効率は極めて低いが経口ルートでウシ間で伝播することを確認した。また、L-BSE は経口接種によりカニクイザルに感染が成立することから、L-BSE がヒトに経口感染する可能性は否定できない。従って、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 対策は維持が必要と思われる。
- カニクイサルを用いた感染実験から、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明らかとなった。
- BSE プリオンの *ex vivo* 解析系として、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。
- 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。
- 定型スクレイピー、非定型スクレイピーおよび北米由来の CWD のヒトへの伝播リスクは極めて低いことが示唆された。
- プリオン感染により、ドーパミン作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンは傷害を受けにくい、グルタミン作動性ニューロンが傷害されるという、プリオン病の病態を論じる上での新規知見を得た。

研究分担者

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 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)

A. 研究目的

1980年代半ばに出現した牛海綿状脳症 (定型 BSE、以下“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スクリーニング並びに特定部位の除去によるヒトへの感染リスクの低減措置、並びに、動物由来飼料の使用規制により、vCJD と C-BSE の発生は収束している。一方、能動的サーベイランスにより非定型 BSE (H-BSE と L-BSE) の存在が明らかとなった。非定型 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 (Huor et al., PNAS, 2019)。平成 29-31 年度に実施した厚労科研究事業では、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の病態解析、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) ヒツジスクレイピーを高感度・高精度に検出する Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) の構築

定型スクレイピーとして我が国で発生し、マウスへの伝達性および PrP^{Sc} の生化学性状から性状が異なる 4 株 (SB, Y5, S3, B3) を用いた。このうち、B3 は我が国で発生したスクレイピーを接種した実験感染ヒツジの試料である。非定型スクレイピーとして、農研機構動物衛生部門が英国から輸入した非定型スクレイピーを、同部門で実験感染させたヒツジの材料 (#42) を使用した。非感染ヒツジ脳乳剤は、ウエスタンプロットにより PrP^{Sc} 陰性が確認されたヒツジの延髄から作製したものを使用した。

基質として、マウス (Mo)、バンクボール (Bv)、ハムスター (Ha)、ウシ (Bo)、シカ (Cer)、およびヒツジ (Sh) (アミノ酸型の違いにより Sh-ARQ, Sh-VRQ, Sh-ARR の 3 種) の組換え PrP (rPrP) を用いた。さらに、8 種類の rCerPrP と rMoPrP のキメラ rPrP を使用した。基質プレー

トリーダとして TECAN F200 を用いた。プレートは 96 well optical bottom plate (Thermo Fisher) を使用し、下方測定によりチオフラビン (ThT) 蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 10 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, 100 μ M EDTA, 10 μ M ThT を基本とし、必要に応じて、NaCl および rPrP の濃度、pH および SDS 濃度を変更した。また攪拌スピードは 432 rpm とした。RT-QuIC は一検体につき 4 ウェルを使用し、3 回以上の独立した実験を実施した。

1-2) Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) を阻害する脂質の除去法の検討

PrP^{Sc} 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_{Mo}/177N_{Mo} を用いた。

10% マウス脳乳剤とエタノールを 2:8 の割合で混和し、遠心によりエタノール抽出画分と不溶性画分に分離した。エタノール抽出各部は乾燥後に少量のエタノールに溶解後に PBS で再構成した。不溶性画分は PBS で再構成した。

10% マウス脳乳剤と rMoPrP を結合した Ni²⁺キレート磁性ビーズを反応させ、rMoPrP に結合する分子をプルダウンした。ビーズをブタノール:メタノール 5:1 (Bu/Me) で処理して、不溶性の画分は PBS で再構成した。可用性の画分は脂質を含む画分として乾燥後に、少量の Bu/Me に再溶解し、PBS で再構成した。

総リン脂質 (TPLs)、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)、sphingomyelin (SP)、cholesterol (CH) を使用した。ヒトの脳の脂質組成を参考に、0.0028%~0.00012% の濃度で使用した。

PBS に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。RT-QuIC は上述の通りに実施した。

1-3) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の作出

サルに馴化したプリオンの性状を解析する *in vitro* の実験系を構築することを目的として、カニクイザル Prnp 遺伝子を安定的に発現するヒト神経芽細胞 IMR32 細胞において、サル馴化 C-BSE プリオンが安定的に増殖できるか否かを追跡した。また解析精度を高めるために、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^{Sc} の蓄積評価

L-BSE 感染ウシ脳乳剤 (50g) を経口投与 88 ヶ月後に斃死し、ウェスタンブロット (WB) 法により中枢神経系における PrP^{Sc} の蓄積を確認した個体 (#6781) について、筋組織およびリンパ組織における PrP^{Sc} の蓄積を Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) を用いて評価した。

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^{Sc} の蓄積を超高感度プリオン検出法である PMCA を用いて評価した。

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 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 接種群 : 2015 年 10 月 26 日に H-BSE 感染ウシの 10% 脳乳剤 (20 μ g 脳重量相当) を 2 頭 (#24、#25) に脳内接種、また 20% 脳乳剤 (8 mg 脳重量相当) を 2 頭 (#26、#27) に経口

投与を実施し、継続的に観察を行った。脳内接種を行った#24は2020年8月17日(1757日目:4年10か月)、#25は2021年2月19日(1942日目:5年4か月)に、経口投与を行った#027は2020年8月18日(1758日目:4年10か月)、#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。

L-BSE接種群: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。

カニクイザルは定期的に、行動解析(ビデオ撮影動画のスコアリング、摂食行動観察、神経・精神症状評価)、および機能解析(運動機能評価:アップルテスト;高次脳機能解析:食物回収試験)、皮質脳波測定を実施した。

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。神経症状が一過性に認められた個体は、安楽死直後にMRI撮像撮像を実施した。その後病理解剖を実施し、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。

<L-BSEプリオン経口接種カニクイザルの組織および体液からのプリオンの検出>

カニクイザルの体内で増えたプリオンを検出するためのPMCAおよびRT-QuICの反応条件を検討し、脳、脾臓、脳脊髄液(CSF)、尿、血漿中のプリオンの存在を調べた。

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

国内で摘発された従来型スクレイピー(6症

例)、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)、米国および英国で摘発された従来型スクレイピー(各1症例)、実験感染従来型スクレイピー(CH1641型を含む4症例)および北米で摘発されたCWD(オジロジカ:2症例、エルク:4症例)の10%または1%脳乳剤をTgHu129MMマウスに脳内接種した。経過を観察し、行動異常等の神経症状を呈した個体は安楽死し、WB法や免疫組織化学染色(IHC)法を用いてPrP^{Sc}を検出した。脳内接種800日を経過した個体については、神経症状の有無に関わらず安楽死し、PrP^{Sc}の蓄積をWB法およびIHC法を用いて調べた。

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

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^{Sc}の検出を試みたが、脳組織からPrP^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}は検出されなかった。

3-3) L-BSE およびCWD接種ハムスターにおける選択的神経傷害の解析

検出等の改良が必要である。

ハムスターへの接種は LBSE、CWD、263K ハムスター馴化株およびマウス Obihiro 株を使用した。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。GLUT1、VGLUT2、VGAT、DAT、VMAT2、NMDAR1、GLuR1、GLuR2、D1R および D2R 抗体を用いて IHC を実施して、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロンの傷害を解析した。

(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、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) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

1-1) ヒツジスクレイピーを高感度・高精度に検出する Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) の構築

合計 16 種の rPrP を使用し、ヒツジスクレイピーの PrP^{Sc} を高感度に検出できる rPrP を調べた結果、rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} (CerPrP の aa169, aa173 を相応するマウスのアミノ酸に置換したもの) が定型スクレイピープリオンの検出用基質の候補となることが明らかとなった。

rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} は、性状の異なる定型スクレイピー株の Y5, SB, S3, B3 を高感度に検出できた。また、非定型スクレイピーも高感度に検出できた。しかし、非定型スクレイピーの検出は、非感染ヒツジ脳乳剤存在により大きく阻害されたことから、引き続き、阻害物質の影響を受けにくい基質の解析、あるいは、阻害物質を除去する方法との組み合わせによる

1-2) Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) を阻害する脂質の除去法の検討

マウス脳乳剤のエタノール抽出画分を再構成した画分は RT-QuIC 反応を完全に阻害した。一方、エタノール不溶性画分を再構成した画分は RT-QuIC 反応を阻害しなかったことから、脳乳剤中の RT-QuIC 阻害因子はエタノールに可用性の分子であることが判明した。

中枢神経系組織に存在するリン脂質の RT-QuIC 阻害活性を調べた結果、脳乳剤中に含まれるリン脂質のうち sphingomyelin (SP) が、RT-QuIC の阻害因子となることが明らかとなった。

グリセロリン脂質 (PC、PE、PG) 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 TPLs 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 10³ 程度改善された。

同様に、0.0028% の TPLs の存在は、H-, L-BSE、および定型スクレイピーの検出用の RT-QuIC を阻害するが、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。従って、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。

1-3) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の作出

カニクイザルの Prnp を安定発現する IMR32 に C-BSE 感染カニクイザルの脳ホモジネートを接種した後、連続継代しても、PrP^{Sc} は持続的に検出された。IMR32 細胞はヒト Prnp を発現するので、産生された PrP^{Sc} がヒト PrP^C 由来かカニクイザル PrP^C 由来かという点を、3F4 抗体 (サル PrP とヒト PrP に反応) と 1E4 抗体 (ヒト PrP への反応性が強い) を用いた WB により調べた。その結果、IMR32 細胞で産生された PrP^{Sc} は、主としてカニクイザル PrP^C を基質として生じた PrP^{Sc} であることが判明した。

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^Cによるプリオン増殖の干渉を排除するために、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出した。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。ヒト PRNP ノックアウト IMR32 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^{Sc}の蓄積評価

L-BSE プリオン経口感染ウシ (#6781: 投与後 88 ヶ月)の末梢組織における PrP^{Sc}の蓄積を詳細に検討するため、PMCA 法を実施したところ、WB 法では PrP^{Sc}が検出されなかった坐骨神経および交感神経幹から PMCA 法により PrP^{Sc}が検出された。可食部である筋組織では、最長筋と大腰筋からは PMCA 法を用いても PrP^{Sc}は検出されなかったが、上腕三頭筋、大腿四頭筋および肋間筋からは PrP^{Sc}が検出された。一方、今回調べたリンパ組織では回腸パイエル板では PMCA でのみ PrP^{Sc}が検出された。一方、経口投与 153 ヶ月 (#9383)で安楽死したウシの中樞神経系組織、末梢神経系組織、および回腸パイエル板から、WB 法および PMCA 法ともに、PrP^{Sc}は検出されなかったことから、L-BSE は効率が悪いが経口ルートでウシに伝播することが判明した。

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 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 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、令和 3 年度までに安楽死した#024 と#027、および、令和 4 年度に安楽

死した#025 と#026 とともに、脳およびリンパ組織への PrP^{Sc}の蓄積は認められなかった。従って、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。

<L-BSE プリオン経口接種カニクイザルの組織および体液からのプリオンの検出>

カニクイザル順化 L-BSE プリオンを高感度に検出可能な PMCA を構築し、L-BSE プリオン経口接種サル 2 個体の脳および脾臓乳剤をシードとして連続PMCAを行った。その結果、3 から 7 ラウンドの PMCA により、経口接種サル 2 個体の脳および脾臓乳剤から PrP^{Sc}の増幅が認められた。しかし、陰性対照でも非特異的な増幅が生じることがあるため、別途 RT-QuIC を構築し、脳内接種サル 1 頭および経口接種サル 2 頭の CSF、尿、血漿中の PrP^{Sc}を解析した。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ことから、L-BSE が経口ルートで霊長類に感染することが確認された。

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

国内で摘発された従来型スクレイピー (6 症例)、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)、米国および英国で摘発された従来型スクレイピー (各 1 症例)、実験感染従来型スクレイピー (CH1641 型を含む 4 症例) および北米で摘発された CWD (オジロジカ: 2 症例, エルク: 4 症例) の脳乳剤を TgHu129MM マウスに接種 800 日後まで観察したが、神経症状を呈する個体は現れなかった。従って、これら動物プリオンのヒトへの感染には高い種の壁が存在することが明らかとなった。

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^{Sc} 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^{Sc} は検出されなかった。従って、Huor ら (2019) が報告した、非定型スクレイピープリオンから C-BSE 様プリオンが出現すること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

異種間 PMCA により CWD プリオンから C-BSE 様のプリオンが出現したことから、この現象を確かめるために、CWD 病原体のソースを増やして実験を行った。TgBov マウス脳乳剤を基質とした PMCA 法により、CWD 脳乳剤 4 個体すべてから C-BSE 様の PrP^{Sc} が増幅した。この結果が、CWD プリオンが異種間伝播により C-BSE 様プリオンにより変化したのか、CWD プリオン内に僅かに存在していた C-BSE 様プリオンが選択されてきたのかを調べるために、以下の実験を実施した。

135°C、30 分間の AC 処理により、CWD 感染脳乳剤に含まれる PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} とは異なっていた。AC 処理 CWD 感染脳乳剤をシードとして ToBov 脳乳剤を用いて PMCA を行ったところ、C-BSE 様 PrP^{Sc} の増幅を認めた。従って、CWD プリオン中に C-BSE 様プリオンが存在することが示唆された。

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^{Sc} は増幅しなかったが、AEE 存在下では PrP^{Sc} 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^{Sc} は、H-BSE の PrP^{Sc} と非常によく似ていた。

3-3) L-BSE および CWD 接種ハムスターにおける選択的神経傷害の解析

BSE、CWD 接種ハムスターにおける PrP^{Sc} 沈着は、線条体、黒質に一致してみられたが、ドーパミン作動性ニューロンマーカーである DAT 抗体の陽性像は対照動物と同様によく保たれていた。また、大脳皮質では PrP^{Sc} の沈着程度にかかわらず、GABA 作動性ニューロンマーカーである VGAT の減弱はみられなかった。BSE プリオン感染モルモットでも、大脳皮質で PrP^{Sc} 沈着が高度の部位においても GABA 作動性ニューロンはよく維持されていた。一方、プリオン株にかかわらず PrP^{Sc} 沈着程度に一致して、大脳皮質のグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである VGluT1 陽性像が減弱していた。

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

1-1) ヒツジスクレイピーを高感度・高精度に検出する Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) の構築

定型スクレイピープリオンは rMo/CerPrP のキメラ組換体の中に、有用な基質があることから、実用的な RT-QuIC が構築された。一方、同じ基質で、非定型スクレイピープリオンを高感度に検出できたが、定型スクレイピーと明らかに異なり、0.01% の非感染ヒツジ脳乳剤存在下で反応が完全に阻害された。従って、定型、非定型スクレイピーを同一条件で検出できる RT-QuIC の構築が理想であるが、別々の条件が必要となる。

1-2) Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) を阻害する脂質の除去法の検討

脳乳剤中の RT-QuIC 反応阻害因子は、エタノール抽出画分に含まれること、rMoPrP に結合すること、さらにはブタノール/メタノールで抽出されることから、脂質であることが推定された。rMoPrP 結合磁性ビーズにより rMoPrP と共沈降する画分には、SDS-PAGE 後の銀染色

で染色される多くの因子が存在しており、特定の阻害因子の同定には至らなかった。

Hoover らは (J Virol, 2017)、脳内のリン脂質が RT-QuIC 反応の阻害物質の一つであることを報告していることから、脳内の脂質組成を考慮して、TPLs、PC、PE、PS、SM の RT-QuIC 反応の阻害効果を調べたところ、SM に強い阻害効果があることを見いだした。また、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、PC、PE、PS を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、この方法が RT-QuIC 用試料の前処理法として有用であることが確認できた。

1-3) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の作出

サル馴化 C-BSE プリオンが、サル PrP を安定発現するヒト神経芽細胞腫由来の IMR32 細胞において安定的に持続感染・増殖することを見出し、この細胞の ex vivo 解析系としての有用性を高めるために、CRISPR/Cas9 法によりヒト PRNP 遺伝子を欠失させた。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

2-1) L-BSE プリオン経口感染ウシの末梢組織における PrP^{Sc} の蓄積評価

ウシ間における L-BSE の経口伝播効率は極めて低いことが判明した。しかし、L-BSE が経口ルートで霊長類に感染すること、また、経口感染ウシ末梢組織に微量のプリオンが検出されること、さらに、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^{Sc} が検出されたことから、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。

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 脳内接種カニクイサル 1 頭および経口接種サル 2 頭からの CSF および尿から RT-QuIC により PrP^{Sc} 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。これまでに L-BSE プリオンの経口接種によりネズミキツネザルで感染が成立した事例は報告されているが、よりヒトに近いカニクイザルで感染が成立した報告はなく、本研究がはじめての例である。

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 か月目に安楽死し、解剖を実施したが、いずれの個体も臨床症状および特徴的な神経病理組織象を呈さず、WB および IHC でも PrP^{Sc} 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 プリオンと比べて低いことが明らかとなった。

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

TgHu129MM マウスモデルによる定型スクレイピープリオン、非定型スクレイピー、および CWD の伝達試験結果から、これらのプリオンのヒトへの伝達には高い種の壁が存在することが明らかとなった。日本で発生した定型スクレイピー Shikaoi-3 脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脾臓で、IHC では PrP^{Sc} 陽性反応が認められたが、WB では PK 抵抗性の PrP^{Sc} が検出されなかった。この脾臓組織の感染性を確認するため、再度 TgHu129MM マウスに接種したが、伝達しなかった。

Huor ら (2019) が報告した、ヒツジおよびヤギからウシへの異種間伝達により、非定型スクレイピープリオンから、C-BSE 様プリオンが出現する可能性について検証したが、非定型スク

レイピープリオンの異種間伝達による C-BSE 様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

上述のように、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°Cオートクレーブ処理および未処理の CWD 感染脳乳剤から PMCA により C-BSE 様 PrP^{Sc}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。

3-3) L-BSE および CWD 接種ハムスターにおける選択的神経傷害の解析

BSE、CWD 接種ハムスターでは、ドーパミン作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンともに、PrP^{Sc}沈着部位を含めよく維持されていた。一方、大脳皮質を中心に PrP^{Sc}沈着部位でグルタミン酸作動性ニューロンの減少がみられた。今回検討したプリオン株のうち、L-BSE と CWD プリオン株感染ハムスターでは、大脳皮質および海馬において AMPA 型受容体の一つである GLuR1 の発現に変化がみられた。このことは、グルタミン作動性ニューロンの減少のみならず、後シナプス側にも傷害が生じていることを示唆している。興奮性ニューロン/シナプスが選択的に障害を受けるといふ知見は、プリオン病の神経病態を考える上で極めて興味深い。

E. 結論

本研究で得られた特に重要な知見を箇条書きで示す。

- 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。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。
- L-BSE プリオンは効率は極めて低いものの経口ルートでウシ間で伝播することが確認できた。また、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。
- L-BSE は経口接種により、カニクイザルに感染が成立することが示唆された。
- カニクイザルを用いた感染実験から、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。
- 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。
- 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。
- 定型スクレイピー、非定型スクレイピーおよび北米由来の CWD のヒトへの伝播リスクは極めて低いことが示唆された。
- プリオン感染により、ドーパミン作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンは傷害を受けにくい、グルタミン作動性ニューロンが傷害されるという、プリオン病の病態を論じる上での新規知見を得た。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - II. 研究成果に刊行物一覧を掲載した。
2. 学会発表

件数が多いため割愛した。各年度の総括・分担
研究報告書に記載した通りである。

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

II. 研究成果に関する刊行一覧表

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
Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Denkers ND, Mathiason CK, Hoover EA, <u>Horiuchi M.</u>	Involvement of N- and C-terminal region of recombinant cervid prion protein in its reactivity to CWD and atypical BSE prions in real-time quaking-induced conversion reaction in the presence of high concentrations of tissue homogenates.	<i>Prion</i>	14	283-295	2020
Tanaka M, Yamasaki T, Hasebe R, Suzuki A, <u>Horiuchi M.</u>	Enhanced phosphorylation of PERK in primary cultured neurons as an autonomous neuronal response to prion infection.	<i>PLoS One</i>	15	e0234147	2020
Uchiyama K, Miyata H, Yamaguchi Y, <u>Imamura M.</u> , Okazaki M, Pasiana AD, Chida J, Hara H, <u>Atarashi R.</u> , Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S	Strain-dependent prion infection in mice expressing prion protein with deletion of central residues 91-106.	<i>Int. J. Mol. Sci.</i>	21	7260	2020
Nakagaki T, Ishibashi D, Mori T, Miyazaki Y, Takatsuki H, Tange H, Taguchi Y, Satoh K, <u>Atarashi R.</u> , Nishida N	Administration of FK506 from late stage of disease prolongs survival of human prion-inoculated mice.	<i>Neurotherapeutics</i>	17	1850-1860	2020
Ubagai K, Fukuda S, Mori T, Takatsuki H, Taguchi Y, Kageyama S, Nishida N, <u>Atarashi R.</u>	Discrimination between L-type and C-type bovine spongiform encephalopathy by the strain-specific reactions of real-time quaking-induced conversion.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	526	1049-1053	2020
Matsubara T, Satoh K, Homma T, Nakagaki T, Yamaguchi N, <u>Atarashi R.</u> , Sudo Y, Uezono Y, Ishibashi D, Nishida N	Prion protein interacts with the metabotropic glutamate receptor 1 and regulates the organization of Ca ²⁺ signaling.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	525	447-454	2020
Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Denkers ND, Mathiason CK, Hoover EA, <u>Horiuchi M.</u>	Involvement of N- and C-terminal region of recombinant cervid prion protein in its reactivity to CWD and atypical BSE prions in real-time quaking-induced conversion reaction in the presence of high concentrations of tissue homogenates.	<i>Prion</i>	14	283-295	2020
Suzuki A, Sawada K, Erdenebat T, Yamasaki T, <u>Tobiume M.</u> , Suga K,	Monitoring of chronic wasting disease using real-time quaking-induced conversion assay in Japan.	<i>J Vet Med Sci</i>	83	735-1739	2021

<u>Horiuchi M.</u>					
Imoto D, Yamamoto I, Matsunaga H, Yonekura T, Lee ML, Kato Kan, Yamasaki T, Otsuguro K, <u>Horiuchi M</u> , Iijima N, Kimura K, Toda C.	Refeeding activates neurons in the dorsomedial hypothalamus to inhibit food intake and promote positive valence..	<i>Mol Metab.</i>	54	101366	2021
Takahashi RH, Yokotsuka M, <u>Tobiume M</u> , Sato Y, Hasegawa H, Nagao T, Gouras GK.	Accumulation of cellular prion protein within β -amyloid oligomer plaques in aged human brains.	<i>Brain Pathol.</i>	31	e12941	2021
Zhang Y, Ozono S, Tada T, <u>Tobiume M</u> , Kameoka M, Kishigami S, Fujita H, Tokunaga K.	MARCH8 Targets Cytoplasmic Lysine Residues of Various Viral Envelope Glycoproteins.	<i>Microbiol Spectr.</i>	23	e0061821	2022
Imamura M, Tabet N, Iwamaru Y, Takatsuki H, Mori T, <u>Atarashi R.</u>	Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system. B	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	613	67-72	2022
Takatsuki H, Imamura M, Mori T, <u>Atarashi R.</u>	Pentosan polysulfate induces low-level persistent prion infection keeping measurable seeding activity without PrP-res detection in Fukuoka-1 infected cell cultures.	<i>Sci Rep</i>	12	7923	2022
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
Pasiana AD, Miyata H, Chida J, Hara H, <u>Imamura M</u> , <u>Atarashi R</u> , Sakaguchi S.	Central residues in prion protein PrP ^C are crucial for its conversion into the pathogenic isoform.	<i>J Biol Chem</i>	298	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	7575	2022
<u>Atarashi R.</u>	RT-QuIC as ultrasensitive method for prion detection.	<i>Cell Tissue Res</i>	392	295-300	2023