

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. ヒツジスクレイピープリオンを検出する RT-QuIC 法の構築

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

研究分担者 宮澤 光太郎 (農研機構・動物衛生部門)

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

これまで、組換えシカ PrP(rCerPrP) を用いて定型 BSE および非定型 BSE プリオンを高感度・高精度に検出・識別可能な Reat-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) を構築してきた。ヒツジスクレイピープリオンは国内でもマウスへの伝達性や異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) のタンパク分解酵素 (PK) 感受性等の違いから複数の株の存在が報告されている。また近年、我が国で非定型スクレイピーの発生も報告されている。そこで、本年度は、定型スクレイピー、非定型スクレイピーを含め性状の異なるスクレイピープリオンを高感度・高精度に検出可能な RT-QuIC の構築を進めた。性状の異なる 4 種の定型スクレイピー罹患ヒツジの脳乳剤をシードとして、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) を基質として RT-QuIC を実施した。これらの基質の中には、感度 (単純希釈による検出限界)、および精度 (非感染ヒツジ脳乳剤存在下における検出限界) とともに実用に耐えうるレベルの基質は存在しなかった。そこで、Mo/Cer のキメラ rPrP8 種を試した。その結果、アミノ酸 (aa) で C 末端側が RT-QuIC の高感度化および安定化に向けての重要な知見と思われる。

A. 研究目的

英国で発生して世界各地に広がった BSE (定型 BSE, C-BSE) は、飼料規制などの管理措置が有効に機能して、現在その発生は制御下にある。しかし、定型 BSE とは性質が異なる BSE (非定型 BSE) が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。

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^{1,2)}。

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³⁾。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。また、各種動物由来プリオン株の識別、および宿主域を推定する試験管内検査法は、数年にわたる期間を有する実験動物に変わる方法として、その確立は重要な課題である。

そこで、本研究では、定型スクレイピー、非定型スクレイピーのプリオンを高感度・高精度に検出する方法の確立を進めた。

B. 研究方法

1) ヒツジスクレイピー試料

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。使用したヒツジスクレイピーの性状は既報である⁴⁾。

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、ウエスタンブロットにより 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。

2) RT-QuIC 法

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、図 2 に示す、rCerPrP と rMoPrP の各種キメラ rPrP を使用した⁵⁾。基質プレートリーダーとして TECAN F200 を用いた。プレートは 96 well optical bottom plate (Thermo Fisher) を使用し、下方測定によりチオフラビン (ThT) 蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 10 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, 100 μM EDTA, 10 μM 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。

3) RT-QuIC の評価

RT-QuIC の反応時間は 60 時間とした。PBS を陰性対照としたときの蛍光強度の平均+5SD を threshold として、threshold を越えたウェルを陽性とした。陽性となるまでの時間を lag phase として RT-QuIC の効率の指標とした。また、seed を PBS で 10 倍段階希釈した試料における検出限界、および seed を 0.01% (10⁻⁴) の非感染ヒツジ脳乳剤を含む PBS で 10 倍段階希釈した試料からの検出限界との比較から、基質の有用性を評価した。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

1) 定型スクレイピーの検出に有効な rPrP の評価。

まず、Mo、Bv、Ha、Bo、Cer、Sh-ARQ、Sh-VRQ、Sh-ARR の 8 種の rPrP の RT-QuIC における定型スクレイピー Y5 株との反応性を調べた (表 1)。rBvPrP と rShPrP-ARQ は PBS よる seed の希釈列では検出限界 (End-point) が <10⁻⁹ および 10⁻⁸ と、高感度検出が可能であった。しかし、rBvPrP と rShPrP-ARQ の反応は、0.01% (10⁻⁴) の非感染ヒツジ脳乳剤により、検出限界が 10⁻⁴ および 10⁻⁵ に低下した。従って、実際には脳組織中に存在する微量のプリオンの検出には不向きであると思われる。それ以外の基質では、seed を PBS で希釈した場合では検出限界が 10⁻⁷ 以下であり、0.01% の非感染ヒツジ脳乳剤存在下では 10⁻⁴ ~ 10⁻⁵ であった。rShPrP-ARR は、0.01% の非感染ヒツジ脳乳剤の存在/非存在にかかわらず、検出限界が 10⁻⁶ であった。従って、用いた 8 種の rPrP は、RT-QuIC によるヒツジスクレイピープリオンの検出の実用に耐えうる基質とはならなかった。

そこで、rCerPrP の CWD プリオン、BSE プリオンの検出の有用性を調べるために作出した、rMoPrP と rCerPrP のキメラ PrP⁵⁾ 8 種を用いて、RT-QuIC による定型スクレイピー Y5 株の検出を行った (図 1)。使用した rMo/Cer キメラ PrP の中で、rCer^N-MoPrP (N 末端から aa153 までが CerPrP、それ以降の C 末端側が MoPrP) が seed を PBS で希釈した場合では検出限界が 10⁻⁸、0.01% の非感染ヒツジ脳乳剤存在下では 10⁻⁷ であった。rCer^N-Mo^CPrP (N 末端から aa222 までが CerPrP、それ以降の C 末端側が MoPrP) も検出限界は rCer^N-MoPrP と同じく、seed を PBS で希釈した場合では検出限界が 10⁻⁸、0.01% の非感染ヒツジ脳乳剤存在下では 10⁻⁷ であった。0.01% の非感染ヒツジ脳乳剤存在下では seed が低希釈 (10⁻⁴, 10⁻⁵) であっても lag phase が 20 時間以上延長することから、rCer^N-Mo^CPrP は、rCer^N-MoPrP よりも脳乳剤の影響を受けやすいと考えられた (表 2)。

rCer^N-Mo-Cer^CPrP (aa154~aa223 までが MoPrP) および 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) は、seed を PBS で希釈した場合では低希釈 (10⁻⁴, 10⁻⁵) で lag phase が 15 時間以内と短く、検出限界が <10⁻⁹ と高感度であったが、rCer^N-Mo^CPrP および rCer^N-MoPrP よりも非感染脳乳剤の影響を

受けやすく、0.01%の非感染ヒツジ脳乳剤存在下の検出現限界は 10^{-6} であった。

以上の結果から、定型スクレイプリープリオンの検出には複数の rMo/CerPrP が基質の候補となることが明らかとなった。

2) 性状の異なる定型スクレイプリープリオンの検出

複数の rMo/CerPrP が定型スクレイプリープリオン検出用 RT-QuIC の基質の候補となることが明らかとなったことから、Y5 に加えて、SB, S3, B3 の性状の異なる定型スクレイプリーのプリオンを RT-QuIC により検出した (表 3)。基質として rShPrP-ARQ と有用である可能性が高い rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} を比較した。その結果、seed を PBS で希釈した場合、rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} の SB, S3, B3 の検出限界は $<10^{-9}$ であり、rShPrP-ARQ を用いた時よりも高感度に各種定型スクレイプリープリオンを検出できた。0.01%の非感染ヒツジ脳乳剤存在下では、検出感度が 10^{-3} ほど低下するが、それでも SB および S3 株では 10^{-6} 希釈まで検出できた。B3 株の検出限界は 10^{-5} であった。

3) 非定型スクレイプリーの検出

rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} が性状の異なる定型スクレイプリープリオンを高感度に検出できたことから、非定型スクレイプリーの検出を行った (表 4)。Seed を PBS で希釈した場合、rShPrP-ARQ を用いた時の検出限界は 10^{-7} であったが、rCerPrP-173S_{Mo}/177N_M を用いた場合の検出限界は $<10^{-9}$ であり、rCerPrP-173S_{Mo}/177N_M は非定型スクレイプリープリオンの検出にも応用可能であると思われるが、lag phase が 50 時間以上と長いこと、さらに、0.01%の非感染ヒツジ脳乳剤存在下では、RT-QuIC で非定型スクレイプリープリオンが検出されなくなることから、検出効率の良い基質ではないと思われた。

D. 考察

定型スクレイプリープリオンは rCerPrP-173S_{Mo}/177N_M など rMo/CerPrP の中に、有用な基質があることから、seed の PBS 希釈列を用いた検出感度に加えて、非感染脳乳剤の影響を受けにくい基質を選ぶことで、定型スクレイプリープリオン検出用の RT-QuIC が構築できると思われる。また、使用したスクレイプリー株の中で、スクレイプリー S3

株は野生型マウスに伝達しないという特徴があるが、rShPrP-ARQ を用いた RT-QuIC では、S3 の検出が 0.01%非感染ヒツジ脳乳剤存在下で完全に阻害されたことから、RT-QuIC においても S3 は他のスクレイプリープリオンと大きく性状が異なることが判る。

一方、rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} は非定型スクレイプリープリオンを高感度に検出できたが、lag phase を見る限り、効率良い RT-QuIC 反応であるとは言えず、実際に、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。

E. 結論

定型スクレイプリープリオン検出用の RT-QuIC に使用する基質として、マウス PrP とシカ PrP のキメラ PrP が有用であった。Seed を PBS で希釈した時の検出感度と比較して、0.01%の非感染ヒツジ脳乳剤存在下で検出感度は低下するが、ある程度の感度で性状の異なる定型スクレイプリープリオンの存在を検出できることから、定型スクレイプリープリオン検出用の RT-QuIC はほぼ構築できた。しかし、定型スクレイプリープリオンの検出条件は、非定型スクレイプリープリオンの高精度検出系に応用できなかった。両者を高感度・高精度に検出可能な条件の検討が必要である。

<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. Horiuchi M, Nemoto T, Ishiguro N, Furuoka H, Mohri S, Shinagawa M. Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *J Clin Microbiol*, 2002 40(9): 3421-3416. doi: 10.1128/jcm.40.9.3421-3426.2002.
5. Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Denkers ND, Mathiason CK, Hoover EA, Horiuchi M. 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. *Prion*, 2020 14(1): 283-295. doi: 10.1080/19336896.2020.1858694.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Denkers ND, Mathiason CK, Hoover EA, Horiuchi M. 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. *Prion*, 2020

14(1): 283-295.

doi: 10.1080/19336896.2020.1858694.

- 2) Tanaka M, Yamasaki T, Hasebe R, Suzuki A, Horiuchi M. Enhanced phosphorylation of PERK in primary cultured neurons as an autonomous neuronal response to prion infection. *PLoS One*, 2020 15(6): e0234147. doi: 10.1371/journal.pone.0234147.

2. 学会発表

- 1) 田中 美咲、山崎 剛士、長谷部 理絵、鈴木章夫、堀内 基広 プリオン感染初代培養神経細胞における神経細胞自律的変化の解析 第163回日本獣医学会、2020年9月
- 2) 鈴木章夫、澤田和平、山崎剛士、堀内基広 高濃度脳組織乳剤存在下での real-time quaking-induced conversion 反応における全長組換えシカプリオンタンパク質固有の反応性 第163回日本獣医学会、2020年9月 2019.

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

rPrP	Diluent	Lag phase (h)						End-point	Ratio
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
Mo	PBS	21.9 ± 4.4	29.2 ± 5.2	52.7 ± 12.7	>60.0	>60.0	59.4 ± 1.2	10 ⁻⁶	10 ⁻¹
	NBH	23.7 ± 2.9	55.8 ± 7.3	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	
Bv	PBS	10.7 ± 1.0	24.3 ± 14.2	35.4 ± 1.5	52.1 ± 5.7	55.7 ± 3.8	57.1 ± 3.7	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁵
	NBH	53.2 ± 11.8	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	
Ha	PBS	31.0 ± 3.6	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	1
	NBH	48.8 ± 19.3	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	
Bo	PBS	16.6 ± 1.3	59.3 ± 1.2	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	10 ⁻¹
	NBH	54.2 ± 10.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	
Cer	PBS	15.6 ± 0.9	26.9 ± 4.3	39.6 ± 10.2	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	10 ⁻²
	NBH	46.4 ± 7.2	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	
Sh (ARQ)	PBS	15.6 ± 1.7	20.1 ± 1.5	45.9 ± 5.0	>60.0	53.8 ± 10.8	>60.0	10 ⁻⁸	10 ⁻³
	NBH	51.6 ± 0.8	50.4 ± 5.9	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	
Sh (VRQ)	PBS	14.4 ± 2.1	24.8 ± 6.3	49.6 ± 9.0	57.4 ± 4.5	>60.0	>60.0	10 ⁻⁷	<10 ⁻⁴
	NBH	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>10 ⁻⁴	
Sh (ARR)	PBS	12.7 ± 1.0	27.3 ± 1.7	46.2 ± 10.1	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	1
	NBH	34.5 ± 5.2	31.8 ± 11.6	34.6 ± 10.1	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	

表 1. 各種 rPrP を基質とした RT-QuIC による定型スクレイパー Y5 株の検出

数値は lag phase を示す。Y5 ヒツジ脳乳剤を seed として PBS あるいは 0.01%非感染ヒツジ脳乳剤 (NBH, Normal brain homogenate) で 10 倍段階希釈した。RT-QuIC は 60 時間計測し、検出限界 (End-point) を求めた。また、PBS で希釈した時のエンドポイントに対する 0.01%非感染ヒツジ脳乳剤で希釈した時のエンドポイントの比を Ratio とした。

rPrP	
rCerPrP	33 58 75 92 100 141 173 206 230 233 25- G G G G G - S M L Y N T V I I R Q - G A 233 59 83 112 148 177 216 232 167 223
rMoPrP	71 108 163 227 59 91 137 169 219 230 23- C - T S S - G N L M W S N I V V K D G R S 231 79 96 144 202 226 173 214 229
rCer ^N -MoPrP	153 25- G G G G G - S M L Y S N I V V K D G R S 231 150
rMo ^N -CerPrP	149 23- C - T S S - G N L M W N T V I I R Q - G A 233 154
rCer-Mo ^C PrP	222 25- G G G G G - S M L Y N T V I I K D G R S 231 219
rMo-Cer ^C PrP	219 23- C - T S S - G N L M W S N I V V K D G R S 233 223
rCer ^N -Mo-Cer ^C PrP	153 223 25- G G G G G - S M L Y S N I V V K D G R S 233 150 218
rMo ^N -Cer-Mo ^C PrP	149 219 23- C - T S S - G N L M W N T V I I K D G R S 231 154 222
rCerPrP- 173S _{Mo} /177N _{Mo}	173 169 25- G G G G G - S M L Y S N V I I R Q - G A 233 173 177
rMoPrP- 169N _{Cer} /173T _{Cer}	177 173 23- C - T S S - G N L M W N T V V R D G R S 231 169 173

図 1. RT-QuIC の基質として使用した rMoPrP と rCerPrP のキメラ rMo/CerPrP の構造

MoPrP の領域はグレー、CerPrP の領域は白で示した。アミノ酸の違いはアミノ酸番号を付して一文字表記で示した。

rPrP	Diluent	Lag phase (h)						End-point	Ratio
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
rCerPrP	PBS	15.6 ± 0.9	26.9 ± 4.3	39.6 ± 10.2	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	10 ⁻²
	NBH	46.4 ± 7.2	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	
rMoPrP	PBS	21.9 ± 4.4	29.2 ± 5.2	52.7 ± 12.7	>60.0	>60.0	59.4 ± 1.2	10 ⁻⁶	10 ⁻¹
	NBH	23.7 ± 2.9	55.8 ± 7.3	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	
rCer ^N -MoPrP	PBS	9.3 ± 0.5	17.2 ± 6.1	30.7 ± 9.2	58.5 ± 3.8	59.8 ± 0.4	>60.0	10 ⁻⁸	10 ⁻¹
	NBH	14.1 ± 4.5	25.3 ± 10.1	57.5 ± 3.5	49.2 ± 11.8	>60.0	>60.0	10 ⁻⁷	
rMo ^N -CerPrP	PBS	18.3 ± 2.2	42.3 ± 5.8	54.4 ± 5.3	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	10 ⁻¹
	NBH	39.3 ± 22.4	46.5 ± 23.4	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	
rCer-Mo ^C PrP	PBS	20.1 ± 16.2	20.7 ± 2.9	38.4 ± 9.5	57.8 ± 4.1	57.1 ± 4.7	>60.0	10 ⁻⁸	10 ⁻¹
	NBH	44.9 ± 14.6	48.8 ± 12.5	55.0 ± 8.2	58.3 ± 4.2	>60.0	>60.0	10 ⁻⁷	
rMo-Cer ^C PrP	PBS	17.4 ± 5.0	34.4 ± 16.6	30.1 ± 9.4	39.5 ± 17.7	>60.0	>60.0	10 ⁻⁷	10 ⁻¹
	NBH	17.1 ± 1.4	23.1 ± 12.6	50.7 ± 8.5	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	
rCer ^N -Mo-Cer ^C PrP	PBS	10.0 ± 1.9	14.3 ± 4.3	23.0 ± 5.7	54.3 ± 8.0	58.4 ± 4.0	59.5 ± 1.9	<10 ⁻⁹	<10 ⁻³
	NBH	14.8 ± 5.7	20.5 ± 9.2	44.4 ± 16.6	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	
rMo ^N -Cer-Mo ^C PrP	PBS	36.4 ± 18.3	52.1 ± 10.4	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	<10 ⁻²
	NBH	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>10 ⁻⁴	
rCerPrP-173S _{Mo} /177N _{Mo}	PBS	8.7 ± 1.9	11.8 ± 1.2	16.7 ± 2.2	24.6 ± 5.9	55.2 ± 6.7	58.9 ± 2.7	<10 ⁻⁹	<10 ⁻³
	NBH	35.7 ± 12.4	32.3 ± 4.4	53.1 ± 11.9	>60.0	>60.0	59.3 ± 1.8	10 ⁻⁶	
rMoPrP-169N _{Mo} /173T _{Mo}	PBS	30.8 ± 10.8	55.2 ± 8.4	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	10 ⁻²
	NBH	46.5 ± 19.4	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	

表 2. 各種 rMo/CerPrP を基質とした RT-QuIC による定型スクレイピー Y5 株の検出

rPrP	Scrapie	Diluent	Lag phase (h)						End-point	Ratio
			10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
rShPrP (ARQ)	SB	PBS	15.1 ± 2.1	17.8 ± 1.5	50.9 ± 7.9	54.7 ± 9.1	>60.0	>60.0	10 ⁻⁷	10 ⁻¹
		NBH	26.5 ± 11.5	51.2 ± 15.3	51.9 ± 14.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	
	Y5	PBS	15.6 ± 1.7	20.1 ± 1.5	45.9 ± 5.0	>60.0	53.8 ± 10.8	>60.0	10 ⁻⁸	10 ⁻³
		NBH	51.6 ± 0.8	50.4 ± 5.9	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	
	S3	PBS	34.0 ± 10.9	37.3 ± 11.4	50.1 ± 9.1	57.4 ± 4.5	>60.0	59.7 ± 0.6	<10 ⁻⁹	>10 ⁻⁶
		NBH	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>10 ⁻⁴	
	B3	PBS	19.0 ± 2.8	46.2 ± 4.9	58.5 ± 2.6	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	10 ⁻²
		NBH	31.7 ± 8.5	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁴	
rCerPrP-173S _{Mo} /177N _{Mo}	SB	PBS	7.6 ± 0.6	13.0 ± 2.8	21.9 ± 5.3	53.4 ± 6.0	57.6 ± 2.1	58.1 ± 3.3	<10 ⁻⁹	<10 ⁻³
		NBH	19.0 ± 4.8	25.6 ± 2.1	42.9 ± 17.8	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	
	Y5	PBS	8.7 ± 1.9	11.8 ± 1.2	16.7 ± 2.2	24.6 ± 5.9	55.2 ± 6.7	58.9 ± 2.7	<10 ⁻⁹	<10 ⁻³
		NBH	35.7 ± 12.4	32.3 ± 4.4	53.1 ± 11.9	>60.0	>60.0	59.3 ± 1.8	10 ⁻⁶	
	S3	PBS	30.3 ± 11.3	15.0 ± 2.6	22.7 ± 8.6	42.7 ± 3.5	55.4 ± 8.0	51.5 ± 13.9	<10 ⁻⁹	<10 ⁻³
		NBH	52.1 ± 10.0	44.5 ± 15.9	48.8 ± 10.4	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	
	B3	PBS	32.4 ± 4.5	17.2 ± 2.4	33.1 ± 6.1	57.8 ± 3.9	>60.0	58.4 ± 2.7	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁴
		NBH	55.5 ± 4.2	53.4 ± 5.8	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁵	

表 3. rShPrP と rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} を基質とした RT-QuIC による各種定型スクレイピープリオンの検出。定型スクレイピーとして SB, Y5, S3, B3 を使用した。

rPrP	Scrapie	Diluent	Lag phase (h)						End-point	Ratio
			10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
rShPrP (ARQ)	Y5	PBS	15.6 ± 1.7	20.1 ± 1.5	45.9 ± 5.0	>60.0	53.8 ± 10.8	>60.0	10 ⁻⁸	10 ⁻³
		NBH	51.6 ± 0.8	50.4 ± 5.9	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10 ⁻⁶	
	Atypical	PBS	30.6 ± 2.7	38.7 ± 2.3	47.0 ± 0.7	56.9 ± 5.3	>60.0	>60.0	10 ⁻⁸	>10 ⁻⁴
		NBH	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>10 ⁻⁴	
rCerPrP-173S _{Mo} /177N _{Mo}	Y5	PBS	8.7 ± 1.9	11.8 ± 1.2	16.7 ± 2.2	24.6 ± 5.9	55.2 ± 6.7	58.9 ± 2.7	<10 ⁻⁹	<10 ⁻²
		NBH	35.7 ± 12.4	32.3 ± 4.4	53.1 ± 11.9	>60.0	>60.0	59.3 ± 1.8	10 ⁻⁶	
	Atypical	PBS	50.3 ± 11.4	42.9 ± 9.8	58.4 ± 2.8	57.1 ± 5.0	57.4 ± 4.5	53.3 ± 5.6	<10 ⁻⁹	>10 ⁻⁵
		NBH	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>10 ⁻⁴	

表 4. rShPrP と rCerPrP-173S_{Mo}/177N_{Mo} を基質とした RT-QuIC による非定型スクレイピープリオンの検出

2. 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 (宮崎大学医学部感染症学講座)

研究要旨

本研究は、非定型 BSE を始めとする各種動物プリオン病感染動物に C-BSE プリオン等ヒトに感染し得るプリオンが含まれているかを PMCA 法により推定し、各種動物プリオン病のヒトへの感染リスク評価に資することを目的とする。本年度はまず、ウシ PrP を基質にした異種間 PMCA により複数のシカ慢性消耗病(CWD)感染シカ脳乳剤から C-BSE 様プリオンが検出できるかを調べた。その結果、実験に使用したすべての CWD 感染シカに C-BSE 様プリオンが含まれていること、さらに C-BSE 様プリオン以外に H-BSE 様プリオン等複数のプリオンが含まれていることが示唆された。次に、H-BSE プリオンのヒツジへの異種間伝達を模した異種間 PMCA を行ったところ、C-BSE 様プリオンを含む複数のプリオンが出現した。このことから H-BSE がヒツジに感染した場合、C-BSE 様プリオンが生じる可能性が示唆された。

A. 研究目的

平成29-31年度に実施した厚労科研事業において北米を中心に感染が拡大しているCWDに感染したシカ脳乳剤にC-BSE様プリオンが含まれている可能性を見出した。このことは、これまでヒトへの感染が知られていない動物プリオン病もヒトに感染する可能性を示唆する。そこで本研究では、PMCA法によりCWD、非定型BSEおよび非定型スクレイパー等動物プリオン病の各プリオンからのC-BSE様プリオン等の出現を解析し、各種動物プリオン病の病原体がヒトへ感染するリスク評価に資する。

B. 研究方法

1) 異種間 PMCA

4 個体分の CWD 感染シカ脳乳剤をシード、ウシ PrP 過発現(TgBo)マウス脳乳剤を基質として PMCA を行った。また、H-BSE 実験感染ウシ脳乳剤をシードとして、ヒツジ PrP(遺伝子型: ARQ)過発現(TgOv)マウス脳乳剤を基質として PMCA を行った。PMCA 終了後の反応液の 1/10 量を新しい反応液に加え、再度 PMCA を行った(連続 PMCA)。この操作を最大 11 回繰り返した。

2) PMCA 産物の生化学的性状解析

増幅した PMCA 産物についてウェスタンブロットティング(WB)によりバンドパターンおよび PK

感受性の比較を行った。

3) バイオアッセイ

TgOv マウス脳乳剤を基質として 11 回連続 PMCA した H-BSE シード産物を TgOv マウスに脳内接種した。

(倫理面への配慮)

本研究は文部科学省の「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」に則り、動衛研および宮崎大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) CWD 感染シカ脳乳剤をシードにした PMCA

TgBo マウス脳乳剤を基質とした PMCA により、CWD 脳乳剤 4 個体すべてから C-BSE 様の PK 抵抗性 PrP(PrPres)が増幅した(図 1. A, B)。それぞれの C-BSE 様 PrPres の PK 抵抗性は、ばらつきが大きかったが(図 1. C)、C-BSE 様プリオンであることがバイオアッセイから明らかになっている CWD#1(緑)より抵抗性は高い傾向にあった。C-BSE 様プリオン以外に WB によるバンドパターンが異なる 2 種類の PrPres が増幅した。それらの PK 抵抗性は C-BSE 様 PrPres より低い傾向にあった。そのうちのひとつは WB バンドパターンから H-BSE 様プリオンであると考えられた(図 1. D)。

2) H-BSE 感染脳乳剤をシードにした異種間 PMCA

H-BSE 脳乳剤をシード、TgOv マウス脳乳剤を基質にした PMCA により、分子量が異なる 3 種類の PrPres (low-type, intermediate-type, high-type)が増幅した (図 2. A)。それらを TgOv マウスに接種したところ、low-type PrPres を接種したマウスはプリオン病を発症したが(生存期間:428±38.1 日)、それ以外の 2 種類を接種したマウスでは発症は認められなかった。Low-type PrPres を接種したマウスに蓄積した異常型 PrP (PrP^{Sc})の WB バンドパターンは C-BSE プリオンを接種した TgOv マウスに蓄積した PrP^{Sc} と非常によく似ており (図 2. B)、脳内の PrP^{Sc} の蓄積および空胞変性の分布パターンといった病理学的性状もよく似ていた (図 2. C、D)。一方、intermediate-type および high-type PrPres を接種したマウスでは、WB では脳内における PrP^{Sc} の蓄積は認められなかったが (図 3. A)、PMCA により PrP^{Sc} の存在が確認された (図 3. B)。PMCA 産物のバンドパターンから脳内の PrP^{Sc} のバンドパターンは接種に用いた PrPres の生化学的性状を維持している可能性が考えられた。

D. 考察

すべての CWD に感染したシカ脳に C-BSE 様プリオンが含まれている可能性が示唆された。また、C-BSE 様プリオン以外のプリオンも含まれていることが示唆され、CWD 感染シカ脳には、複数の表現型を示さないプリオン株が含まれていると考えられた。また、H-BSE 感染脳乳剤にも C-BSE 様プリオンを含む複数のプリオン株が含まれている可能性が示された。

CWD プリオンおよび H-BSE プリオンをシードにした異種間 PMCA で C-BSE 様プリオンが出現したが、これらのプリオンが異種間 PMCA により C-BSE プリオンに変化した可能性も考えられる。今後異種間 PMCA で CWD および H-BSE プリオンが変化して C-BSE 様プリオンになったのか、それぞれのプリオンに極微量の C-BSE 様プリオンが含まれているのか調べる必要がある。

E. 結論

CWD 感染シカ脳乳剤および H-BSE 感染ウシ脳乳剤は共に異種間伝達を模した異種間 PMCA に

より C-BSE 様プリオンが出現することが示された。このことは、様々な動物プリオンには表現型を示さない程度の極微量の C-BSE 様プリオンが含まれているか、あるいは、異種間伝達することにより、ある動物プリオンが C-BSE 様プリオンに変化する可能性を示唆する。したがって、直接ヒトへの感染性を示さない動物プリオンも他種動物へ伝達することでヒトに感染し得るプリオンが生じるリスクがあると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchiyama K, Miyata H, Yamaguchi Y, Imamura M, Okazaki M, Pasiana AD, Chida J, Hara H, Atarashi R, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S. Strain-dependent prion infection in mice expressing prion protein with deletion of central residues 91-106 *Int J Mol Sci*, 2020 21(9): 7260.
- 2) Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Impairment of cerebellar long-term depression and GABAergic transmission in prion protein deficient mice ectopically expressing PrPLP/Dpl. *Sci Rep*, 2020 10(1): 15900.
- 3) Nakagaki T, Ishibashi D, Mori T, Miyazaki Y, Takatsuki H, Tange H, Taguchi Y, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Administration of FK506 from late stage of disease prolongs survival of human prion-inoculated mice. *Neurotherapeutics*, 2020 doi.org/10.1007/s13311-020-00870-1.
- 4) Ubagai K, Fukuda S, Mori T, Takatsuki H, Taguchi Y, Kageyama S, Nishida N, Atarashi R. Discrimination between L-type and C-type bovine spongiform encephalopathy by the strain-specific reactions of real-time quaking-induced conversion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020 526(4): 1049-1053.
- 5) Matsubara T, Satoh K, Homma T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Atarashi R, Sudo Y, Uezono Y, Ishibashi D*, Nishida N. Prion protein interacts with the metabotropic glutamate receptor 1 and regulates the organization of Ca²⁺ signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020 525(2): 447-454.

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

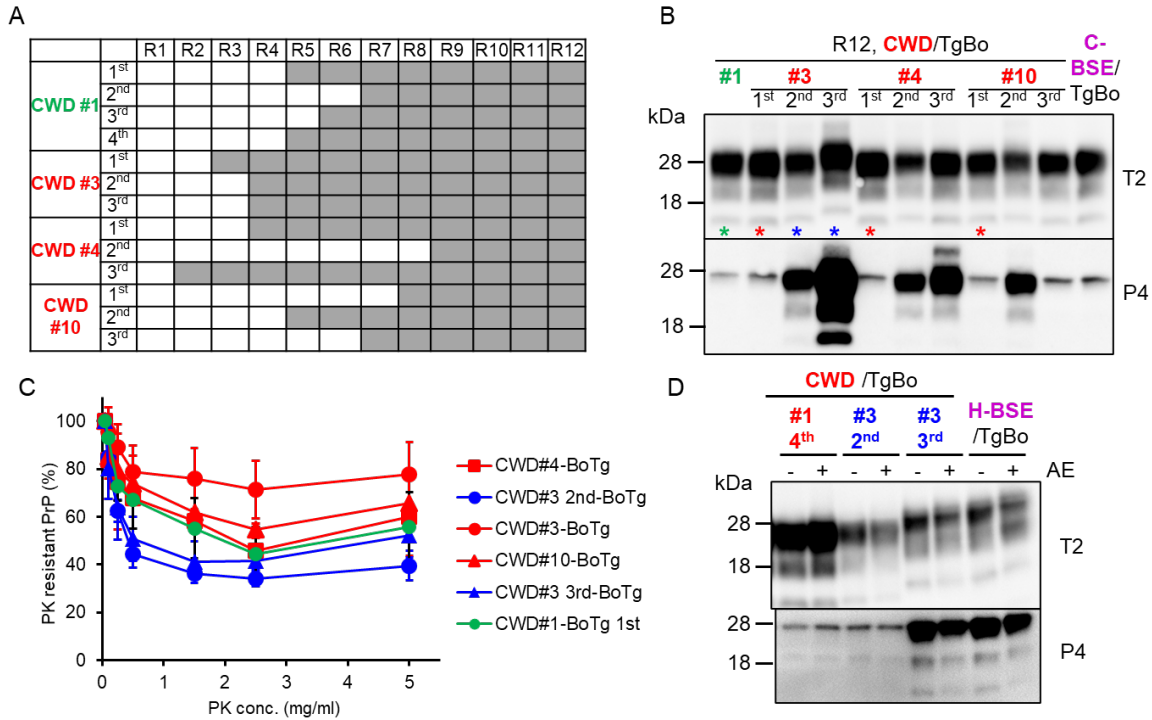


図1. CWD感染脳乳剤をシードにした異種間PMCA. (A) 4個体分のCWD感染脳乳剤 (#1, #3, #4, #10) をシード、ウシPrP発現形質転換(TgBo)マウス脳乳剤を基質にして12ラウンドまで連続PMCAを行った。PK抵抗性PrP(PrPres)が出現したラウンドを灰色で示す。それぞれ3回から4回実験を繰返した。(B) #1以外増幅したすべてのPrPresについて2種類の抗体 (T2, P4)でウエスタンブロッティング(WB)を行った。アスタリスクはPK感受性試験を行ったPrPresを示す。(C) 増幅したPrPresについてPK感受性試験を行った。CWD#1/TgBo 1st (緑) はバイオアッセイによりC-BSE様プリオンであることが明らかになっている。(D) 3回めのCWD#3をシードとしたTgBoマウス脳乳剤PMCA産物 (CWD/TgBo#3 3rd)とH-BSEプリオンシードTgBoマウス脳乳剤PMCA産物(H-BSE/TgBo)のバンドパターンを比較した。

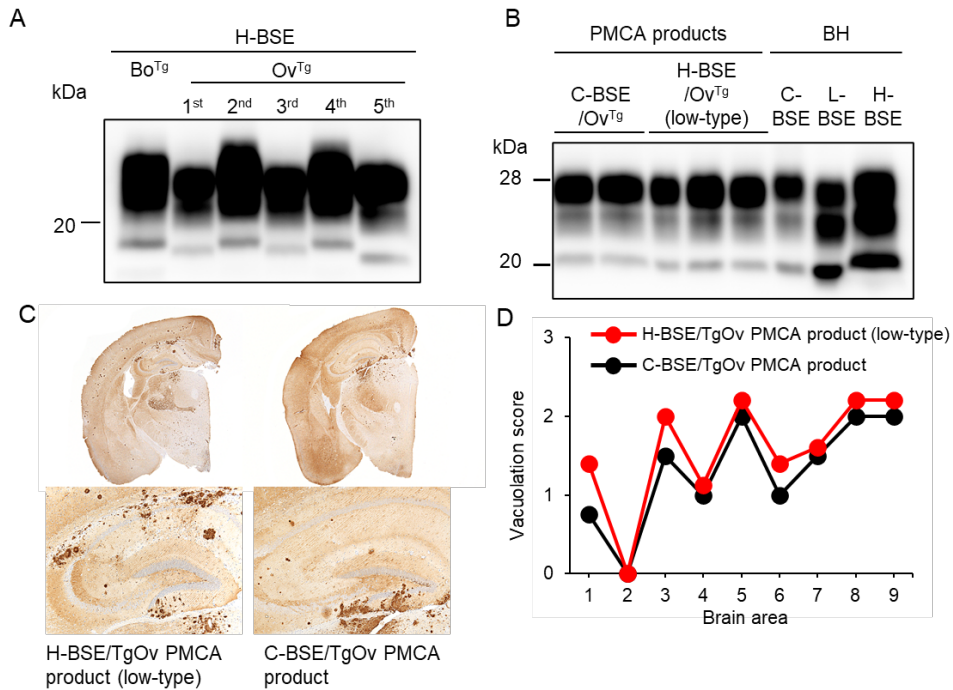


図2. H-BSE感染脳乳剤をシードにした異種間PMCAおよびlow-type PMCA産物のバイオアッセイ。(A) H-BSE感染脳乳剤をシード、ヒツジPrP(ARQ)発現形質転換(TgOv)マウス脳乳剤を基質にして12ラウンドまでの連続PMCAを5回繰返した。分子量が最も高い2nd、4th PrPresをhigh-type、中間の分子量の1st、3rd PrPresをintermediate-type、最も分子量が低い5th PrPresをlow-typeとした。(B) low-type H-BSE/TgOv PMCA産物およびC-BSE感染脳乳剤シードTgOv PMCA産物をTgOvマウスに脳内接種した。それぞれ接種から平均428 ± 38.1日、407.0 ± 46.1日後に発症致死した。C-BSE/TgOv PrPres接種マウスについては2個体、low-type H-BSE/TgOv 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/TgOv PMCA産物およびC-BSE/TgOv 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/TgOv PMCA産物およびC-BSE/TgOv 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.

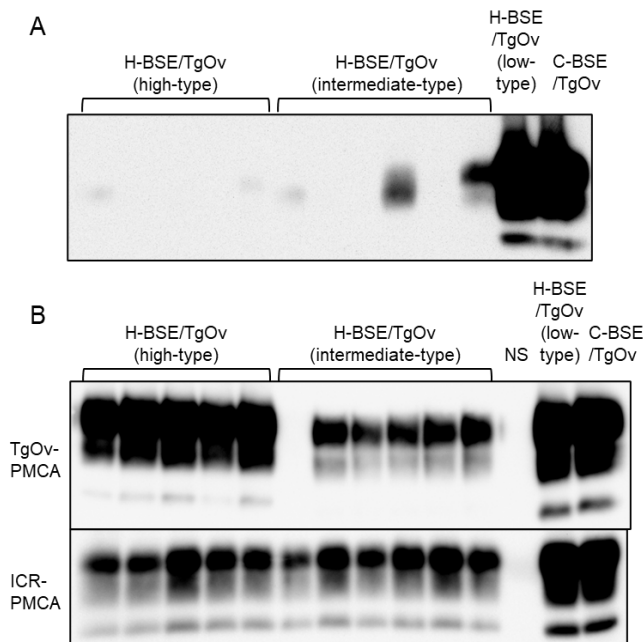


図3. intermediate-typeおよびhigh-type H-BSE/TgOv PMCA産物のバイオアッセイ。(A) intermediate-typeおよびhigh-type H-BSE/TgOv PMCA産物をそれぞれ5匹、6匹のTgOvマウスに脳内接種し、接種後200日から760日で採材した。採材した脳から乳剤を調製し、WBを行った。(B) 各種PMCA産物接種マウス脳乳剤をシードにして、TgOvマウスおよびICRマウス脳乳剤を基質として3ラウンドの連続PMCAを行った。NSはシードなしである。

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 (岡山理科大学大学獣医学部)

保富 泰弘 (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所)

研究要旨

H-BSE の人への感染リスクを評価する目的で、カニクイザル4頭に H-BSE (カナダ由来感染ウシ脳乳剤 (#9458) を脳内に継代接種：農研機構) ウシ脳乳剤を脳内接種 (2頭) および経口接種 (2頭) を行い、継続的な検体 (血液、尿、唾液、脳脊髄液) 採取および臨床病態の観察を行った。接種後4年を経過していずれの個体も明らかな神経症状、行動異常、食物回収試験による高次脳機能試験および皮質脳波による異常所見は認められなかった。接種後4年目10か月目に脳内接種および経口接種の各群1頭において安楽死、解剖を行い病理組織学的検索に供した。H-BSE を脳内接種し継続的に観察を行っている1頭に置いて接種後5年4か月目に欠神発作を認め、皮質脳波では左後頭葉に一過性の周期性放電が認められ、安楽死解剖を実施し、病理組織検索、プリオン蛋白解析用の材料採取を行った。

また、人への BSE 経口感染リスクを評価する目的で、これまでの研究によりサルへ高い病原性を示す L-BSE をカニクイザルに脳内接種し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 (血液、尿、唾液、脳脊髄液) 採取および臨床病態の観察を開始した。

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。しかし、H-BSE のヒトへの伝達性は明らかでない。また、霊長類への経口感染実験は行われているが、感染による神経症状発現の報告はほとんどない。経口感染のリスクを評価する上で、霊長類順化プリオン株を用い、プリオンが異種動物に伝播する過程で性状が変化してヒトへの感染性を獲得する可能性を含めて、感染リスクを検証する必要がある。近年、羊

のプリオン病であるスクレイピーがヒトに伝達する可能性、日本人に発症するプリオン病の8割にあたる人のプリオン病の孤発性クロイツフェルトヤコブ病 (s-CJD) 患者の様々な末梢組織にプリオンが存在することなど、プリオン病の病態の再考を促す知見が報告されており、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。アイソレーターの前面及び側面には窓を設け、前方及び隣のサルとアイコンタクト出来

る環境とした。飼料は固形飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.) 70g 及びリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

2) 実験群および接種材料

H-BSE 接種群: 2015 年 10 月 26 日に BSE (カナダ由来感染ウシ脳乳剤 (#9458) をウシ脳内に継代接種: 農研機構 動物衛生研究部門) 感染ウシの 10%脳乳剤 (0.2 mL: 20 µg 脳重量相当) をカニクイザル 2 頭 (#24、#25) 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) 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#27 は 2020 年 8 月 18 日 (1758 日目: 4 年 10 か月) に安楽死解剖を行った。経口投与を行った#26 は継続観察を行っている。

L-BSE 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。

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。

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、下記のアヒン病指標項目について、サルは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。

アヒン病主要観察項目

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。サルは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) 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。

8) 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) およびブトルファンール (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ヘ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收容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とした。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、うづ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) H-BSE 接種群

H-BSE を接種し経過観察を行っている 4 頭において、接種後 4 年を経過し、明らかな神経症状、精神症状が認められないことから脳内接種群 (#24)、経口投与群 (#27) 各 1 頭について接種後 4 年 10 か月目に安楽死を行った (Table 1)。安楽死前に実施した脳波で明らかな異常は認められなかった。

H-BSE を脳内接種を行った#025 において脳内接種 1940 日目に欠伸発作が認められた。発作は一過性で、徐々に意識を消失し、全身脱力で横臥症状が認められたがその後覚醒し、通常の行動様式を示した。この個体について 2 日後の 1947 日目 (接種後 5 年 4 カ月) に安楽死、解剖を行った。安楽死時に脳波および MRI 測定を行った。皮質脳波では 20 分間測定中に約 10 秒間、左後頭葉を中心として周期性同期性放電 (PSD) 様の所見が認められた。高電位の鋭波が約 1 秒 (0.6~1.2 秒) の短周期で出現した。その後鋭波は消失し、光刺

激でも誘発されなかった (Fig.1)。同個体で撮影した MRI では顕著な異常は認められなかった (Fig.2)。

2) L-BSE 接種群

L-BSE サル脳継代株をカニクイザル 2 頭に経口投与を実施した。投与個体 2 頭中 1 頭で、投与前採材時等に麻酔投与による嘔吐誘発が頻回に認められるため、投与処置後に塩酸メトクロプラミドの筋肉内投与を行うことにより、嘔吐抑制が可能となった。

D. 考察

H-BSE プリオン脳内接種および経口接種を行った各 1 頭について接種後 4 年 10 か月目に解剖を実施した。カニクイザルへの BSE 脳内接種では、これまで実施した C-BSE7 頭、L-BSE 4 頭においていずれも 4 年以内に進行性の神経症状を発症している。特に、L-BSE プリオンを脳内接種したサルは、接種後 1 年 7~8 ヶ月で発症している。本年度はその潜伏期間の 2 倍を経過したことから、各接種群より 1 頭の解剖を行い、病理検索を実施したところ、脳神経へのプリオンの沈着は認められなかった。このことから、H-BSE プリオンの霊長類、ヒトへの伝達性は従来の C-BSE プリオンや L-BSE プリオンと比べ、種の壁を越えにくいことが示唆された。継続的に観察を行う予定であった、2 頭中、脳内接種を行った 1 頭で欠神発作が認められた。欠神発作は一過性で、その後 3 日再発は認められていない。従来であれば、さらに継続的に観察を行う臨床ステージであったが、COVID-19 感染拡大により、地域を超えての移動に制限がかかる可能性が考え、急変に対応できないことから、安楽死解剖とし病理組織解析に供した。皮質脳波測定で短時間一過性に PSD を認めており、プリオン感染による器質的異常を誘発している可能性について検索を進めている。

これまでの BSE プリオンの経口接種実験では C-BSE、L-BSE のいずれも臨床症状の発現が観察されなかった。本研究では、サルへの強い病原性を示したプリオン病発症サル継代株の脳乳剤を大量に経口投与をおこない経口感染のリスクについての評価を開始した。

E. 結論

H-BSE プリオン脳内接種または経口投与カニクイザルはプリオン病に起因する明らかな進行性の病態を示しておらず、接種後 4 年 10 ヶ月を目に安楽死解剖を行うとともに、一過性の神経症状が観察された脳内接種後 5 年 4 カ月目の個体について病理・蛋白検索材料へ供した。

国内で唯一の霊長類を用いたプリオン感染実験を実施できる研究体制を構築していることから、発症機序の解明、人への感染リスクの評価を行っていく。

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

なし

Table 1 BSE感染カニクイザルのプリオン病臨床症状スコア

プリオン病 観察スコア			接種群	H-BSE牛脳乳剤				L-BSEザル脳乳剤		
			接種ルート	脳内接種		経口接種		経口投与		
			個体番号	#24	#25	#26	#27	#32	#33	
			接種日	2015/10/26	2015/10/26	2015/10/26	2015/10/26	2021/1/27	2021/1/27	
		観察日	2020/8/11	2021/2/8	2021/2/17	2021/5/10	2020/8/11	2021/5/10	2021/5/10	
		接種後経過日数	1751	1932	44244	2023	1751	103	103	
		備考			発作発見後	右上胸節自傷				
		解剖日	2020/8/17	2021/2/19		経過観察中	20210/8/18	経過観察中	経過観察中	
神経 症状 スコア	1	立ち上がり	正常 一度でうまくいかない ケージに脚をつけて立ち上がる必要がある。 立ち上がろうとして倒れこむ。 立ち上がることができない。	0	0	2 3	0	0	0	0
	2	転倒	なし ケージの上ろうとして滑り落ちることがある。 起立、歩行時バランスをくずす。 歩行時たまたに転倒 頻繁にバランスをくずし転倒	0	0	1	0	0	0	0
	3	流涎	正常 流涎わずか 常に流涎	0	0	0	0	0	0	0
	4	動作緩慢	なし わずかに緩慢、慎重にやっているように見える 軽度動作緩慢、運動量低下 高度動作緩慢、運動の大きさ低下 無動	0	0	0	0	0	0	0
	5	ミオクローヌス	なし 観察中まれに、四肢、体幹、頭部等がピクッと動く 観察中たまに、四肢、体幹、頭部等がピクッと動く びくっとした動きが明確 動作時等頻繁にピクッと動く。	0	0	0	0	0	0	0
	6	ふるえ	なし 軽度：時にわずかに見られる程度 中等度：気になる程度のふるえ 高度：かなり日常生活の障害となる。 きわめて高度：大部分の日常生活の妨げ	0	0	0	0	0	0	0
精神 症状	7	抑うつ 状態	なし 時々奥に引きこもる。 背中を向けたまま、頭はかかえていない。 頭をかかえこむ。 ケージの奥で頭をかかえた姿勢のままを続ける。	0	0	0	0	0	0	0
	8	揺痺感	指背行動は認められない まれに体を揺く動作(1回) 散発的に体を揺く動作(2-3回) 頻繁に体を揺く動作(4-5回) 常に体を揺く動作をする(6回以上)	0	0	0	0	0	0	0
	9	驚愕反応	手をかざしても、威嚇程度通常反応 手をかざすと、びくっとして飛び退きその後戻る 驚愕反応のあと、びくつく。 驚愕反応のあとバランスをくずす わずかな頻度に変化し、体のバランスを失ってくなく	0	0	0	0	0	0	0
	10	無動性 無言	観察者が立つと通常の反応 かざした手を認識するが、反応低下 かざした手に無反応 全く外界に対応できない無動の時間が出現 無動、目も動かさない	0	0	0	0	0	0	0
	11	自傷行動	自傷行動は認められない まれに自傷行動(外傷なし) 散発的に複数個所の自傷行為(外傷なし) 自傷行為により外傷が認められる。 自傷行動による外傷が認められ夢中に行う。	0	0	0	0	0	0	0
	12	あくび	観察中あくびなし 観察中1回 観察中2回 観察中3回以上 観察中5回以上	0	0	0	0	0	0	0
	13	顔の表情	正常 わずかな表情の乏しさ 軽度であるがはっきりした表情の乏しさ 表情が乏しく、観察者への反応低下 新穎な表情の乏しさ、威嚇しない	0	0	0	1	0	0	0
健康 観察	14	観察中の行動 頻度	ケージによる 回転 歩行 起立 座位 うづくまる 横臥	+	-	-	++	++	++	-
	15	観察	元気 食欲(固形) 食欲(青葉) 慣性状	1	1	1	1	1	1	1
			N	N	N	N	N	N	N	

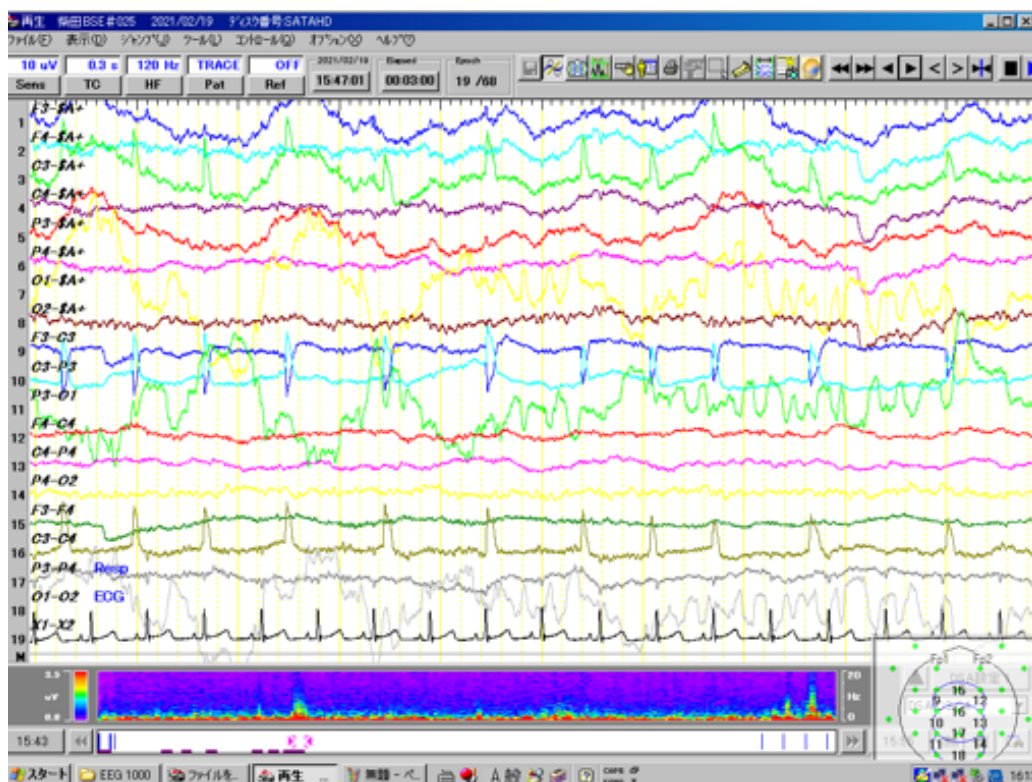


Fig.1 H-BSE脳内接種後5年4カ月経過カニクイザル（# 24）の皮質脳波所見。約1秒周期で周期性放電（PSD）様鋭波が認めらる。測定3日前に欠神発作が認められた。

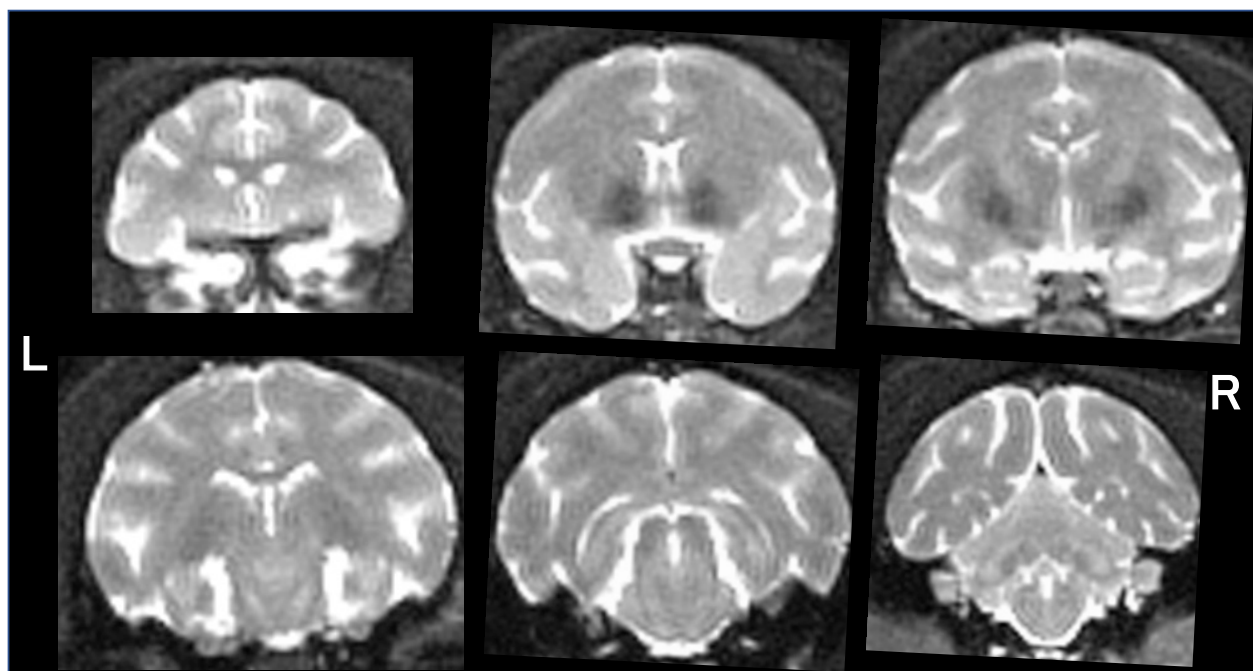


Fig.2 H-BSE脳内接種後5年4カ月経過カニクイザル（# 24）の皮質脳波所見。約1秒周期で周期性放電（PSD）様鋭波が認めらる。測定3日前に欠神発作が認められた。

4. 非定型 BSE 感染カニクイザルの解析

分担研究者 飛梅 実 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究協力者 佐藤 由子 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究要旨

本研究では、定型 BSE プリオンを接種されたマカクサル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、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。本年度は脳内および経口により H-BSE プリオンを接種し 5 年が経過したカニクイサル計 2 頭の病理学的解析を行った。解剖前の観察では神経症状等特異な所見は認められていない。解剖後のサル臓器について病理学的な解析を行った結果、脳内接種および経口投与されたサルの中枢神経および扁桃、脾臓、回腸、腸間膜リンパ節のいずれにおいてもプリオンの沈着を認める臓器は認められなかった。以上から、H-BSE プリオンの脳内接種または経口投与 5 年経過後のサルではプリオンの伝播は確認できなかった。

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いないが、動物モデルを用いた研究から非定型 BSE に分類される L-BSE はヒトへの感染性が示唆される。本研究班においてもカニクイザルへの脳内接種により L-BSE がサルへ伝播することを確認している。本研究ではカニクイザルをモデル動物として用い、H-type BSE が誘導するヒトでの病理学的特徴を明らかにする。

また、BSE に加え動物のプリオン病ではシカにおける慢性消耗疾患 (chronic wasting disease; CWD) が知られている。本邦では確認されていないが、北米や韓国での発生が報告されている。また近年のジビエの拡大からシカも食肉として供されており、本邦における CWD 清浄確認は重要である。本研究では関東近郊に生息する野生シカの一種であるキョンの検体採取、検査方法の確立を行う。

B. 研究方法

1) カニクイザルを用いた非定型 BSE プリオンの伝達性、誘導される病理像の確認

本研究では、定型 BSE プリオンを接種されたマカクサル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、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していく。具体的には、経口的または脳内に非定型 BSE 由来プリオンを接種されたサルの病態観察、および殺処分後の中枢神経系の病理学的変化について検索を行う。病理学的な検討では、空胞変性や神経細胞の脱落等の計測に加え、免疫組織化学的手法を用い蓄積するプリオンの沈着部位、沈着パターン等を明らかにする。

2) キョン検査体制の確立

関東地方に生息するシカであるキョン (*Muntiacus reeves*) を対象とする。本邦ではキョンは特定外来生物に指定され駆除対象となっている。関東近郊での生息地域は東京都・伊豆大島および千葉県・いすみ市近郊であり、両地域に生息するキョンを捕獲し、脳組織を検査材料とする。採取されたキョンの捕獲地域、推定年齢などの情報と共にウエスタンプロット法を用いたプリオンの検索を行う。

(倫理面への配慮)

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

究を行っている。

キョンの採材に関しては「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」に基づき駆除された個体を使用する。

C. 研究結果

1) カニクイサルを用いた非定型 BSE プリオンの伝達性、誘導される病理像の確認

脳内および経口により H-BSE プリオンを接種し5年が経過したカニクイサル計2頭の病理学的解析を行った。解剖前の観察では神経症状等特異な所見は認められていない。

解剖後のサル臓器について病理学的な解析を行い、H-BSE プリオンのサルへの伝播について解析を行った。解剖後のホルマリン固定臓器の肉眼的な観察では、いずれのサルにおいても著変を認めなかった。また、中枢神経系においても各脳室の拡張、皮質の萎縮などプリオン病に特徴的な所見は認めなかった(図1)。パラフィン包埋後の組織病理切片を用いた中枢神経系の観察では、脳皮質および髄質に空胞変性などの著変は無く、炎症性細胞浸潤も認められていない。プリオンの存在の有無については、抗プリオンタンパク質抗体である T4 (ウサギ血清) および 3F4 (マウスモノクローナル抗体) を用いた免疫組織化学手法により検討を行った。脳内接種および経口投与されたサルの中枢神経および扁桃、脾臓、回腸、腸間膜リンパ節について検索を行ったが、いずれにおいてもプリオンの沈着を認める臓器は認められなかった(図2)。

2) キョン検査体制の確立

キョン生息地域である東京都・伊豆大島および千葉県・いすみ市での採取が可能となった。東京都・伊豆大島町では「東京都キョン防除実施計画」に基づき捕獲されたキョンの殺処分立ち会い、現地で脳組織の採取を行う。千葉県・いすみ市での採材は現地・猟師(苅込 様)の協力を得ることが可能になった。ジビエや工芸品への利用を目的として捕獲されたキョンの脳組織は解体時に採取され、凍結保管後に国立感染症研究所に輸送される。

D. 考察

1) カニクイサルを用いた非定型 BSE プリオンの伝達性、誘導される病理像の確認

H-BSE 由来プリオンのサルへの経口投与ならびに脳内接種では5年の観察ではプリオン病に特徴的な症状の発現並びに各種臓器におけるプリオンの沈着は認められなかった。BSE 由来プリオン病であるヒトの vCJD では潜伏期はおよそ8~10年とされている。本研究での観察期間が妥当なものであるか判断できないため、今後サルでの H-BSE プリオンの継代等の検討が必要と考えられた。

E. 結論

1) カニクイサルを用いた非定型 BSE プリオンの伝達性、誘導される病理像の確認

H-BSE 由来プリオンを経口投与もしくは脳内接種されたサルではプリオン病に特徴的な症状の発現並びに各種臓器におけるプリオンの沈着は認められず、5年の観察期間中では H-BSE 由来プリオンのサルへの伝達は確認出来なかった。

2) キョン検査体制の確立

関東近郊のキョン生息地である東京都・伊豆大島および千葉県・いすみ市でのキョン脳組織採取体制が確立できた。新型コロナウイルス感染症蔓延によるヒトの移動制限が解除され次第、年間各100頭を目標に採材及びプリオンの有無について検討を行う。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Reisuke H. Takahashi, Mayumi Yokotsuka Minoru Tobiume, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Toshitaka Nagao, Gunnar K. Gouras. Accumulation of cellular prion protein within β - amyloid oligomer plaques in aged human brains. *Brain Pathology*, 2021;00:e12941.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

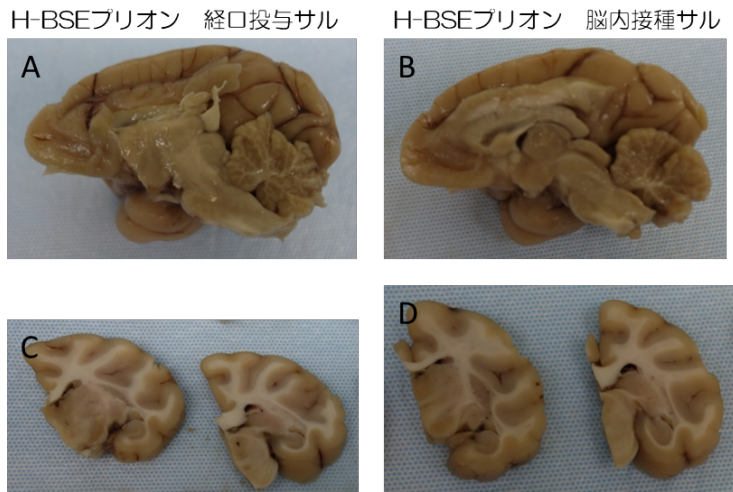
1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

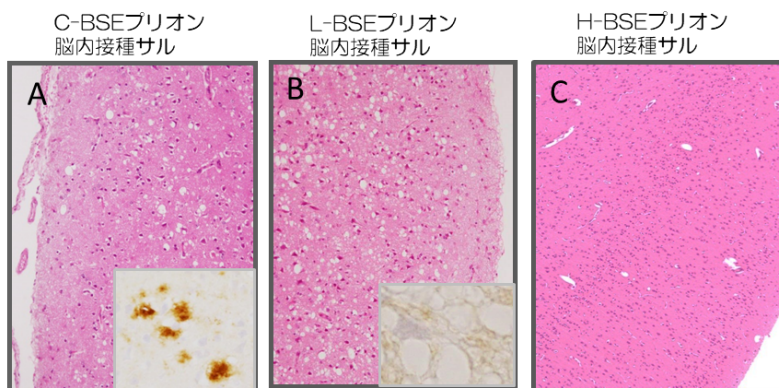
該当なし

図 1



H-BSEプリオン 経口投与サル (A, C) および脳内接種サル (B, D) の脳断面。いずれのサルにおいても脳室の拡大、皮質の萎縮等プリオン病に特徴的な変化は認められない。

図 2



定形BSE (C-BSE) (A)、非定型BSE (L-BSE) (B)、および非定型BSE (H-BSE) (C) 由来プリオン脳内接種サルの大脳皮質。
C-BSEおよびL-BSEプリオン接種サルでは皮質での空胞変性の誘導とプリオンの沈着が認められる。C-BSE接種サルではヒトvCJDと同様のブランク型の沈着が認められ、L-BSE接種サルではシナプス型の沈着が認められる。H-BSE接種されでは空胞変性は誘導されず、プリオンの沈着は確認できなかった。

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探索

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

非定型 H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザル 2 個体、および経口投与したカニクイザル 2 個体の飼育・観察期間が 4 年 10 ヶ月に至った。各接種群から 1 個体を安楽殺に処し、脳（前頭葉、側頭葉、後頭葉、小脳、被殻、脳幹、海馬、延髄）への PrP^{Sc} の蓄積の有無をウェスタンブロット法により検索した結果、PrP^{Sc} は検出限界以下であり、これらの脳部位における H-BSE プリオンの明らかな増殖・蓄積は認められなかった。

また、本研究班ではこれまでにウシ由来の C-BSE プリオンおよび L-BSE プリオンをカニクイザルへ伝播させることに成功し、‘サル馴化 BSE プリオン’を得ている。サル馴化 BSE プリオンが持続感染・増殖できる培養細胞があれば、個体レベルの実験成果を培養細胞レベルの実験系へ発展させることが可能となり、その意義は大きい。幾つかの培養細胞を細胞バンクから選択し、サル馴化プリオンの持続感染が起こるか否かを調べた結果、ヒト由来の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。

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、少なくとも本研究班のこれまでの研究から、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、実験動物を使用する *in vivo* 感染実験はプリオン病の病態や病原体プリオンの組織分布などを解析する上で代替法が無い不可欠な実験系だが、プリオンの細胞生物学的な解析には培養細胞を用いる実験系が有利な面が多い。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。ウシ由来 BSE プリオンや本研究班が所有するカニクイザル馴化 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を *in vitro* で行うことが可能となる。特に、カニクイザル馴化 BSE プリオンを細胞実験系で増殖できるようになれば、これまでのサル個体の実験で得た知見を培養細胞の実験系へ発展させることができる。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、細胞バンクから入手した培養細胞の中からこの目的にかなう細胞株を探索した。

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／投与と経過観察は、小野、柴田による）。接種・投与後、4 年 10 ヶ月経過したカニクイザル（脳内、サル ID #024；経

口、サル ID #027) について、脳の各部位の異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積量を 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。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)、および陰性対照として非感染ザルの脳組織を用いた。

2) カニクイザルへ馴化させたプリオンが増殖できる培養細胞株の探索

JCRB 細胞バンク (医薬基盤・健康・栄養研究所)、BRC 細胞バンク (理化学研究所)、ECACC 細胞バンク (Public Health England) から、N2a (マウス、神経)、IMR-32 (ヒト、神経)、PG-4(S+L-) (ネコ、グリア・アストロサイト)、LLC-RK1 (ウサギ、腎)、RK13 (ウサギ、腎)、CAD (マウス、神経) を入手した。培養のための培地等は、細胞バンクが推奨するものを使用した。

これらの細胞にカニクイザル・プリオン蛋白質を発現させるために、以下の操作を行った。まず、カニクイザル組織から調製したゲノム DNA を鋳型としてプリオン蛋白質遺伝子 (*prnp*) の蛋白質コード領域を含む領域を PCR により増幅し、PCR 産物をクローニングベクターへ挿入し、クローニングによって得た *prnp* の cDNA を PiggyBac プラスミドベクター (System Biosciences, LLC) へ移した。PiggyBac ベクターへクローニングした *prnp* cDNA の塩基配列を DNA シークエンシングにより確認後、リポフェクション法によりプラスミドを細胞へ導入し、プラスミドの薬剤耐性遺伝子 (puromycin または neomycin) による耐性を指標として、遺伝子導入細胞を選択・継代した。

以上の手順で得た細胞を 48 ウェルプレートに播種し、細胞密度が 60~70% に達した時点で、C-BSE または L-BSE の感染により終末期に至ったカニクイザル (C-BSE #007 ; L-BSE #015) の 10% 脳ホモジネート (リン酸緩衝液) を 2~10 μ L 培地へ添加し、以後、培養・継代を通常の細胞培養法に沿って繰り返した。継代を重ねることでカニクイザル脳ホモジネートが十分に希釈されたまでの継代数に達した後、細胞を回収して常法により PrP^{Sc} の有無をウエスタンブロット法により検出した。

(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) 脳の各部位への PrP^{Sc} の蓄積の有無をウエスタンブロット法により検索した。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^{Sc} に由来する陽性シグナルは検出されなかった (幾つかの脳部位では 3F4 抗体陽性のバンドがウエスタンブロット上で検出されたが、バンドの泳動度が典型的な PrP^{Sc} の泳動度と一致せず、また、再試験での再現性が得られなかったことから、PrP^{Sc} 以外の成分への非特異的な交差によるバンドであると判断した)。[図 1、図 2]。

2) 6 種の培養細胞 (N2a、IMR32、PG-4(S+L-)、LLC-RK1、RK13、CAD) に対し、C-/L-BSE 罹患ウシの脳ホモジネートを培地へ添加し、一定期間の培養・継代後にウエスタンブロット法により PrP^{Sc} の有無を調べた。その結果、一定量の PrP^{Sc} が長期間にわたって持続的に検出される細胞は得られなかった (= 持続感染細胞は得られなかった)。一方、これらの細胞にカニクイザルの *prnp* を導入後、カニクイザル馴化 C-/L-BSE プリオン (発症したカニクイザルの脳ホモジネート) を培地へ添加し、一定期間の培養・継代後にウエスタンブロット法により PrP^{Sc} の有無を調べたところ、サル馴化 C-BSE プリオンを培地へ添加して培養・継代した IMR32 細胞の内、5 バッチにおいて細胞の継代を重ねても一定量の PrP^{Sc} が持続的に検出された。細胞をキナクリン存在下で 4 日間培養すると、キナクリン濃度に依存して PrP^{Sc} の検出量が減少した [図 3]。以上から、カニクイザルの *prnp* を導入した IMR32 細胞では、サル馴化 C-BSE プリオンの持続感染・増殖が起きていると考えられた。カニクイザル *prnp* を導入していない IMR32 細胞では、同様の方法でサル馴化 C-BSE プリオンを添加して培養したが、持続的な PrP^{Sc} の検出は

見られなかった。なお、LLC-RK1 細胞においては、外来性のカニクイザル・プリオン蛋白質の発現量は極めて少なかった（ほとんど検出できなかった）。転写・翻訳の抑制が生じているのか、蛋白質の速やかな分解・除去が原因であるのか、今のところ不明である。

D. 考察

ウシ由来の非定型 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後（＝初代伝播）して、4年10ヶ月経過した時点で安楽殺に処して採材した脳の各部位には、ウエスタンプロット法で検出可能な PrP^{Sc} は蓄積していなかった（C-BSE 感染カニクイザル脳では 1.4µg 組織相当中の PrP^{Sc} が明確に検出される感度レベルで、H-BSE 感染カニクイザル脳では 5mg 組織相当を分析にかけても PrP^{Sc} は検出されなかった）。非定型 L-BSE プリオンのウシからカニクイザルへの初代の脳内接種実験では、接種後約2年でサル2個体（投与した全匹）は神経症状を呈し、人道的エンドポイントとの判断された時点で安楽殺に処して採材した回腸、脾臓への PrP^{Sc} の蓄積はウエスタンプロット法の検出限界以下であったが、脊髄や脳には PrP^{Sc} が顕著に蓄積していた[平成27年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 非定型 BSE（牛海綿状脳症）に対する安全対策等に関する研究 報告書]。ウシ L-BSE プリオンの脳内接種実験とは対照的に、H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルは、観察期間中にプリオン病が疑われる外見の神経症状を呈することは無かった。脳の PrP^{Sc} が検出限界以下であったことと合わせて、H-BSE プリオンは脳内接種でも経口投与でも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と考えられた。この結果をそのままヒトへのリスク評価に適用することについては、慎重であるべきだが、ヒト型マウスへ H-BSE プリオンが伝播しないという報告（DOI: 10.3201/eid1412.080941、DOI:10.1099/vir.0.042507-0）、およびカニクイザルへ伝播しないという報告（脳内接種後122ヶ月時点、DOI: 10.1038/srep11573）は、本研究班の H-BSE のカニクイザルへの伝播実験の結果と相反しない。

また、本年度は、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、細胞バンクから入手した培養細胞の中からこの目的にか

なう細胞株を探索した。その結果、カニクイザル *prnp* を導入・発現させたヒト神経芽細胞腫由来の IMR32 細胞が、少なくともサル馴化 C-BSE プリオンの持続感染細胞の樹立に有望であることを見出した。なお、サル馴化 L-BSE プリオンを培地へ添加して培養・継代した IMR32 細胞では、継代の初期において PrP^{Sc} が検出されたが、細胞の継代を重ねるにつれて PrP^{Sc} は検出限界以下となった。L-BSE プリオンも C-BSE プリオンもカニクイザル個体には伝播するので、今回、L-BSE プリオンの IMR32 細胞への持続感染が成立しなかったのは、L-BSE プリオンの添加量が少なかったことが原因なのか（C-BSE プリオンの方が高濃度・多量だった）、それとも、そもそも L-BSE プリオンは本細胞実験系での感染効率が低いためなのか、次年度以降に検討したい。

カニクイザル *prnp* を保有しない IMR32 細胞（内因性のヒト PrP を発現する）では、同様の操作をしても PrP^{Sc} が持続的に検出されることはなかった。これについては、内因性ヒト PrP と外因性サル PrP の発現量の差が原因なのか（内因性ヒト PrP の発現量は低い）、サル馴化 C-BSE プリオンに対するヒト PrP の種の壁/株の壁が存在するためなのか、今後検討したい。

E. 結論

以下の結論を得た。

- 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（ウシからサルへの初代投与）について、脳（前頭葉、側頭葉、後頭葉、小脳、被殻、脳幹、海馬、延髄）への PrP^{Sc} の蓄積の有無をウエスタンプロット法により検索した。PrP^{Sc} の蓄積はウエスタンプロット法の検出限界以下だった。
- サル馴化 BSE プリオンが持続的に感染・増殖できる培養細胞を検索した。カニクイザル *prnp* を導入・発現させた IMR32 細胞が、少なくともサル馴化 C-BSE プリオンの持続感染細胞の樹立に有望であることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

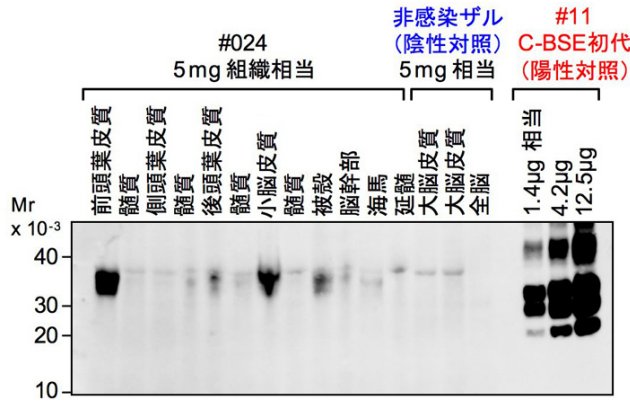
1. 論文発表

なし

2. 学会発表
なし

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



※ このウエスタンブロットでは、前頭葉皮質、側頭葉髓質、後頭葉皮質、小脳皮質、被殻、脳幹部、海馬、などで抗プリオン蛋白質抗体 (3F4) 陽性のバンドが検出されているが、バンドの泳動度や検出像は陽性対照のバンドとは明らかに異なり、また、再試験を行うと再現性が無いことから、異常型プリオン蛋白質によるバンドではないと考えられた。

図1 H-BSE プリオン脳内接種ザル (#024) の脳の PrP^{Sc}

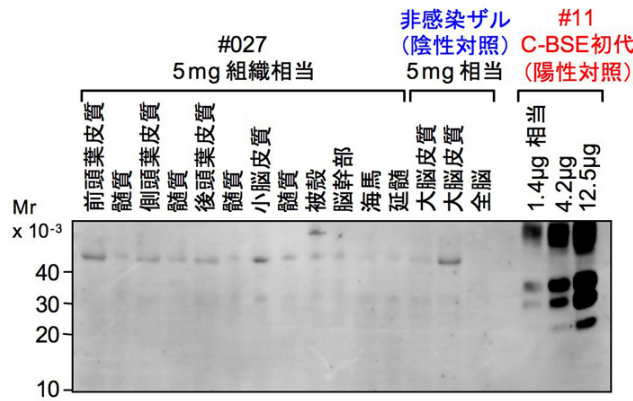


図2 H-BSE プリオン経口投与ザル (#027) の脳の PrP^{Sc}

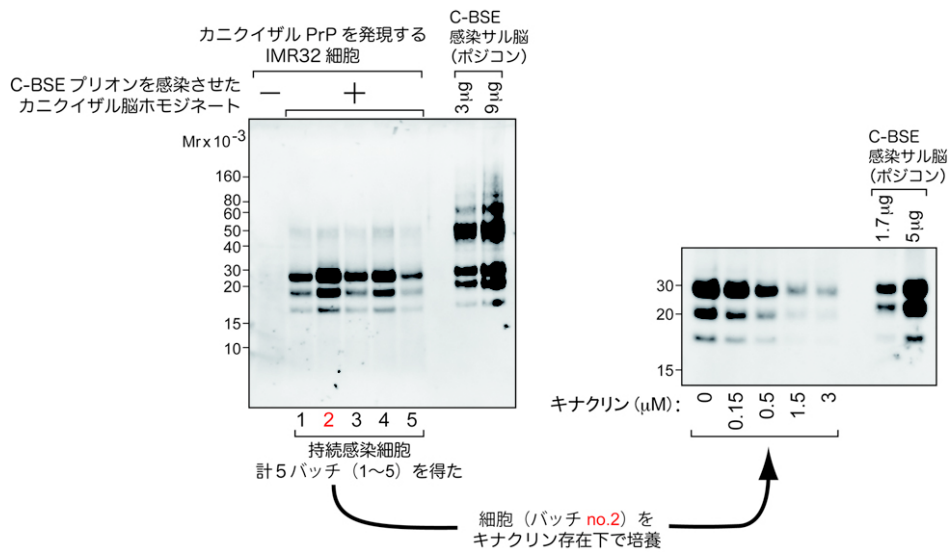


図3 カニクイザル馴化 C-BSE プリオンが持続感染可能なヒト神経芽細胞腫由

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 感染モルモット小脳ではプリオンによる傷害が VGLUT1 陽性ニューロンに選択的にみられる。本研究では、プリオンによるニューロンの減少・消失が、大脳皮質、海馬、間脳においても VGLUT1 選択的に見られるかを検討した。大脳皮質、海馬において PrP^{res} 沈着は軽度で、VGLUT1、VGLUT2 および VGAT 陽性シナプスにおいて減少・消失は見られなかった。視床では PrP^{res} 沈着部位のうち後外側腹側核・後内側腹側核・網様核において VGLUT1 陽性ニューロンの減少・消失が見られた。一方、VGLUT2 および VGAT 陽性ニューロンに変化は見られなかった。視床下部では PrP^{res} 沈着が背内側核、外側野を中心に見られ、乳頭体核、脳弓には見られなかった VGLUT1 ニューロンの選択的障害は確認できなかった。海馬ではアンモン角の CA3 錐体細胞、及び歯状回門の苔状細胞の脱落に伴い、その神経細胞体と樹状突起が分布する領域で非選択的なニューロンの脱落を認めた。一方、苔状線維が inputs する海馬歯状回分子層の深層では VGLUT1 陽性ニューロンの減少を認めた。重度の PrP^{res} 沈着が VGLUT1 発現部位以外でも見られること、および主に VGLUT1 陽性ニューロンが傷害されていることから、VGLUT1 陽性ニューロンの選択的傷害というより、VGLUT2 および VGAT 陽性ニューロンはプリオンに対して抵抗性を持つということかもしれない。プリオンに対するニューロンの選択的な傷害が、プリオン株ごとに特徴的である可能性を検討することは、プリオン株により病態が異なることを説明する可能性がある。

A. 研究目的

C-BSE の起源については、非定型 BSE や非定型スクレイピーとの関連が議論されている。また、非定型 BSE や非定型スクレイピーについては弧発性の可能性を含め議論があるが未だに確定していない。本研究では、C-BSE と L-BSE の関連を明らかにすることや異種間交差伝達による新たな性状を有するプリオン株の発生の可能性を探索することを研究目的の 1 とした。

一方、BSE プリオン株をモルモットに感染させると特徴的な小脳病変が見られる。このような BSE 感染モルモット小脳における病理発生機序を検討したところ、小脳分子層および顆粒層において選択的に小胞性グルタミン酸トランスポーター1(VGLUT1)陽性ニューロンの減少・消失が見られ、これにより特徴的な病変形成に至っていることがわかった。つまり、PrP^{res} の沈着により VGLUT1 陽性ニューロンである平行線維及び苔状線維が選択的減少・脱落し、結果小脳皮質の萎縮が生じていた。このようにプリオンによるニューロンの選択的傷害が、小脳以外にも見られるのか、あるいはプリオン株により傷害されるニューロンに特徴があるのかを明らかにすることを研究目的の 2 とした。

本年度は研究目的の 2 について、これまでに実施した小脳、脳幹病変に引き続き、大脳、間脳および海馬について病理学的検討を行い VGLUT1 陽性ニューロンの選択的減少・消失について知見が得られたので報告する。

B. 研究方法

1) 供試動物及び接種材料

モルモットを 5 匹(Hartley 種、4~5 週齢、雌、日本 SLC、静岡)を購入し、1 週間馴致後に使用した。また陰性対照としてモルモットを 1 匹使用した。

接種材料は BSE 感染牛(BSE/JP4)脳から作製した 10%脳乳剤入りリン酸緩衝液(PBS)をモルモット脳内に接種し 1 代目とした。臨床症状を示した 1 代目モルモット脳から 10%脳乳剤入り PBS を作製して新たなモルモット脳内に接種し、2 代目とした。さらに同様の方法により 3 代目を作製した。3 代目モルモットはそれぞれ接種後 286 日(286 dpi)、294 dpi、309 dpi、312 dpi、313 dpi で解剖、採材を行った。また陰性対照モルモット脳内に、正常モルモット脳から 10%脳乳剤入り PBS を作製して接種し、320 dpi に解剖、採材した。

2) 病理学的検索

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3 μ mパラフィン切片を作製し、HE染色を行った。

免疫組織化学的検索では、一次抗体として12F10, GFAP, Synaptophysin, VGLUT1, VGLUT2, VGAT抗体を用いた。12F10はPrP^{res}, GFAPはアストロサイト, Synaptophysinはシナプス伝達に関与する神経内分泌細胞・ニューロンに対するマーカーとして使用した。VGLUT1, VGLUT2はそれぞれのグルタミン酸作動性シナプスマーカー, VGATはGABA作動性シナプスマーカーとして使用した。二次抗体としてDAKO Envision Kit, ヒストファインペルオキシダーゼ標識抗体MAX-PO(M)を使用した。PrP^{res}の抗原賦活化は135DWHA法により行った。抗PrP^{res}抗体以外の前処理として、オートクレーブ法(121 $^{\circ}$ C, 10分), またはマイクロウェーブ法(DAKO Target Retrieval Solution pH9, DAKO, USA)を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 臨床症状および肉眼所見

BSE感染モルモットの病末期では、被毛粗剛、その後後肢からの運動失調(歩行困難など)、削瘦が見られ、動きが緩慢となった。特徴的な症状として頭部振戦が見られた。剖検時、肉眼的には脳外観に著変は認められなかった。矢状断面および冠状断面においても同様であった。

2) 組織学的・免疫組織化学的検索

すでに報告したように、BSE感染モルモット小脳では、PrP^{res}が重度に沈着し顆粒細胞の消失が見られる部位に一致し、抗Synaptophysin抗体陽性シナプス, VGLUT1陽性ニューロンの減少・脱落が見られた。同位置で重度のグリオーシスが見られた。一方VGLUT2およびVGAT陽性ニューロンに変化は見られなかった。

大脳皮質, 海馬, 視床, 視床下部のHE染色では空胞変性, アストログリアの増生がみられたが、その他に形態的に顕著な変化は見られなかった。BSE感染モルモット大脳におけるPrP^{res}沈着は、視床に比べ軽度で、大脳皮質顆粒細胞層を中心に

沈着が見られた。視床ではおよそ全域で、び漫性に強いPrP^{res}沈着が見られた。視床下部では背内側核, 外側野を中心にPrP^{res}沈着が見られ、乳頭体核, 脳弓には見られなかった。間脳では、視床の後内側腹側核, 視床下部の腹内側核で、グリオーシスは軽度であった。BSE感染モルモットの脳皮質においてVGLUT1, VGLUT2およびVGAT陽性ニューロンはよく保存されており、非感染対照モルモットに比較しても、PrP^{res}沈着かつアストログリア沈着部位での減少・消失は顕著に見られなかった。抗Synaptophysin抗体陽性のシナプスはBSE感染モルモットでも良く保存されていた。

視床ではBSE感染モルモットのPrP^{res}沈着部位のうち、非感染対照モルモットに比べ後外側腹側核(VPL), 後内側腹側核(VPM)および網様核においてVGLUT1陽性ニューロンの減少・消失が見られた。抗Synaptophysin抗体陽性のシナプスは、VGLUT1消失部位と同部位で減少していた。非感染対照モルモットの抗VGLUT2抗体は手綱核, VPMおよび外側中心核で陽性を示し、BSE感染モルモットでも同様の陽性所見を示した。VGAT陽性ニューロンは、BSE感染モルモットおよび非感染対照モルモットで、同様の陽性所見が見られた。後内側腹側核(VPM), 後外側腹側核(VPL)に力する後索核と前庭神経核ではプリオン沈着はほとんど見られず、組織構造, ニューロンの染色性は維持されていた。

感染, 非感染対照モルモットの視床下部ではいずれもVGLUT2陽性ニューロンが顕著に優勢で、VGLUT1陽性ニューロンは腹内側核で軽度に発現しているのみであった。VGLUT2陽性ニューロンは腹内側核, 外側視床下部, 乳頭体核で見られた。VGAT陽性ニューロンはほとんど見られなかった。

海馬では錐体細胞層に顕著なプリオン沈着を認め、特にCA3領域において、神経細胞の脱落と重度の空胞変性を認めた。錐体細胞の樹状突起が伸びる上昇層, 放線層, 網状分子層, 透明層においても軽度から中程度のプリオン沈着と空胞変性を認めたが、網状分子層における病変がより顕著であった。錐体細胞層に認められていたVGAT, VGLUT1, 及びVGLUT2ニューロンの染色性が減弱したほか、CA3領域に一致する上昇層, 透明層, 放線層では強く発現していたVGLUT1ニューロンの減少(染色性低下)を認めた。歯状回においては顆粒細胞層及び分子層は軽度のプリオン沈着は認められたものの、ほぼ正常な組織構造を保持していた。歯状回門(多形細胞層)では重度の空胞形成とプリオン沈着, 大型神経細胞の脱落を認めた。歯状回門ではsynaptophysin, 並びにVGLUT1ニューロンの染色性が低下したほか、

VGAT 陽性ニューロンの神経軸索の減少がみられた。さらに非感染群で見られていた、歯状回分子層深部領域における VGLUT1 の強い発現が、プリオン感染個体では減弱していた。また、海馬に興奮性の軸索を投射する大脳皮質嗅内野IV-V層、及びアセチルコリンを伝達する内側中隔核で軽度のプリオン沈着と空胞変性、及びブローカーの対角束核で中程度のプリオン沈着と空胞変性、神経細胞脱落が見られた。

D. 考察

本研究では視床の VPL, VPM, 網様核において、PrP^{res} 沈着部位に一致して VGLUT1 陽性ニューロンの選択的な消失・減少が見られた。VPL, VPM はいずれも体性感覚の中継核で、情報を經由して大脳皮質 1 次体性感覚野に入力している。VPL は四肢・体幹からの体性感覚情報を伝える一次求心性神経が後索を上行し、後索核でニューロンを変えた後、交叉して内側毛帯を上行し情報が到達する。VPM は頭部からの感覚入力と味覚情報が入力し、三叉神経核を經由して到達、顔面領域と味覚野に投射している。これらが傷害されると感覚障害を生じる。ラットによる実験の報告では後索核については楔状核では VGLUT1, その他では VGLUT2 が優勢に発現、三叉神経核は VGLUT1 または VGLUT2, あるいは 80%以上が VGLUT1 および VGLUT2 を共発現しているため、VPL, VPM に入力する過程の部位で傷害を受けた可能性も考えられた。網様核は GABA 作動性ニューロンが優勢であり、大脳皮質に送る情報と送らない情報を抑制ニューロンにより選別する働きがあると考えられている。網様核に優勢に発現する VGAT 陽性ニューロンは影響を受けず VGLUT1 陽性ニューロンのみが減少・消失することが示された。

海馬アンモン角の CA3 領域の錐体細胞層では VGAT 及び VGLUT2 陽性ニューロンの低下、歯状回門及びその近傍の CA3 領域の放線層、透明層では VGLUT1 陽性ニューロンの低下がみられた。特に CA3 領域では非感染個体で確認された VGAT 陽性の神経線維が減少していた。前者に関してはシナプス後細胞が脱落したことでシナプス構造が破綻したことが推察された。後者に関しても同様に、シナプス後細胞である CA3 錐体細胞と歯状回門の苔状細胞の脱落で説明されうると考えられた。また、歯状回分子層深層で認められた VGLUT1 陽性ニューロンの減少は、苔状細胞の脱落に起因すると推察している。

大脳皮質や間脳視床下部では明らかな VGLUT1 陽性ニューロンの減少・消失は見られなかった。小脳・脳幹・視床に比べ PrP^{res} 沈着が軽度

であったため、その影響が小さくニューロンの脱落まで至っていない、あるいは免疫組織学的な感度により VGLUT1 の選択的減少の所見が得られなかった可能性も考えられた。

E. 結論

BSE 感染モルモットについてプリオンによるニューロンの選択的傷害性について検討した。視床後腹側核群、海馬歯状回において VGLUT1 陽性ニューロンの選択的脱落が確認された。しかしながら、大脳、視床下部ではこのような選択性については確認できなかった。さらに、プリオン株により傷害されるニューロンにそれぞれの特徴を有する可能性を検討することは、プリオン株ごとに病態が異なることを説明する可能性があると考えられた。

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

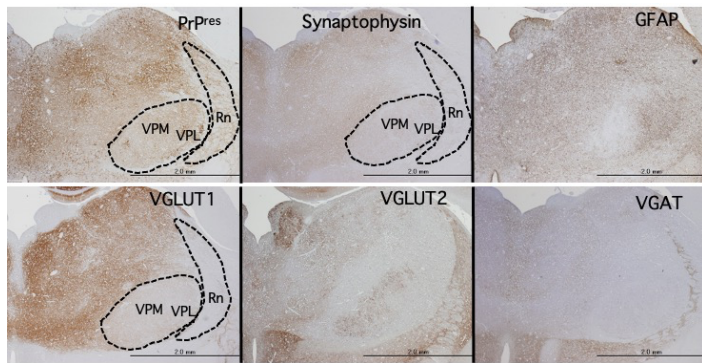


Fig. 1. 後外側腹側核(VPM), 後内側腹側核(VPL), 網様核(Rn)においてVGLUT1陽性ニューロンの減少がみられ, それに一致してSynaptophysinの減少が見られる。VGLUT2, VGATでは, 非感染, 感染モルモットで同様の陽性所見を示す。

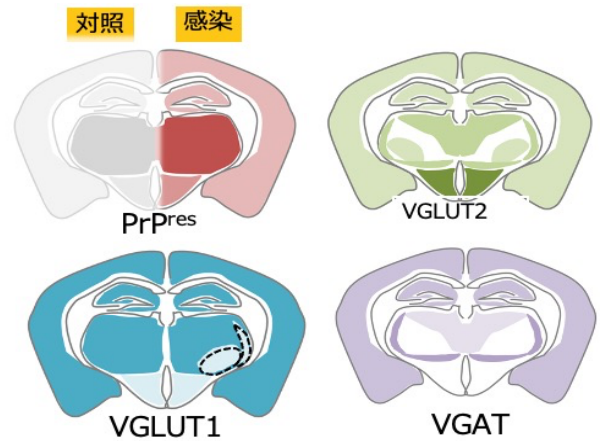


Fig. 2. 大脳, 間脳, 視床下部でのPrPresの分布とVGLUT1, VGLUT2, VGATの陽性所見を示す。大脳, 視床下部では, VGLUT1の選択的脱落は確認できなかった。

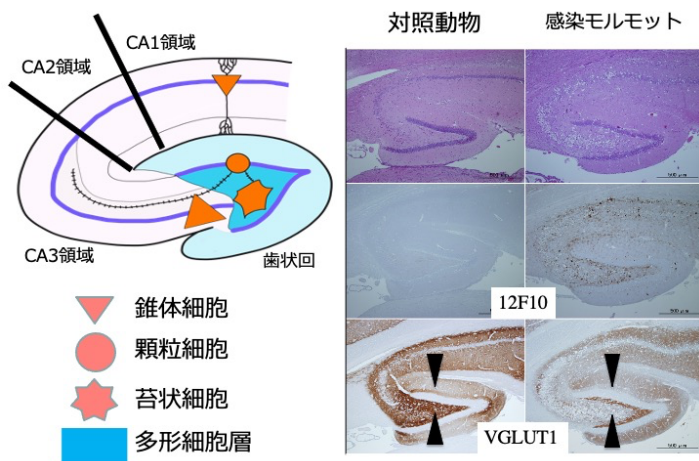


Fig. 3. アンモン角はCA1-CA3の領域に分類され, CA3の錐体細胞は歯状回の多形細胞層に連続する。プリオン感染モルモットでは, 矢頭で示すCA3領域と多形細胞層において, ニューロンの脱落を認めた。

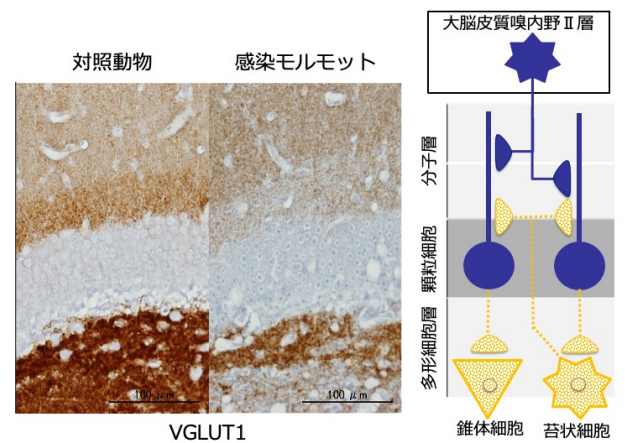


Fig. 4. Fig. 3の詳細。海馬のニューロン脱落には錐体細胞と興奮性介在神経である苔状細胞の脱落が関わる。2つの神経細胞が脱落することで, 顆粒細胞から入力するVGLUT1陽性ニューロンの脱落が見られ, さらに苔状細胞の脱落に伴いその軸索が伸びる分子層深層におけるVGLUT1の染色性が低下していた。

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 動物感染症研究領域 上級研究員
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

我々は非定型 BSE の一種である L-BSE のウシへの経口伝播を強く示唆する結果を得ている。一方、世界ではシカのプリオン病である慢性消耗病の感染が拡大しており、動物由来プリオンのヒトへの伝達リスク評価は今も重要な課題である。本課題では、L-BSE プリオンのウシ間での経口伝播を実験的に証明し、PrP^{Sc} の組織分布を明らかにすることで、L-BSE のリスク管理に重要な知見を提供する。また、ヒト型プリオン蛋白質遺伝子過発現マウスを用いて動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクを推察する。本年度は、L-BSE プリオン経口感染ウシの筋組織の一部および回腸パイエル板に極微量の PrP^{Sc} が蓄積することを PMCA 法により明らかにした。この結果は、と畜場での特定部位の除去が L-BSE のリスク管理にも有効であることを示している。

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^{Sc}) 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^{Sc} 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^{Sc} 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) の感染地域が拡大している。また、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極めて重要である。そこで、ヒト型プリオ

ン蛋白質遺伝子過発現マウス (TgHu129MM) 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 について伝達試験を実施し、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。

B. 研究方法

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 PMCA 法を用いて評価する。加えて、現在経過観察中である L-BSE 感染ウシ脳乳剤 (50g) 経口投与ウシ (#9383) の唾液を 4 ヶ月毎に採取し、PMCA 法による PrP^{Sc} の検出を試みる。

2) 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)、

非定型スクレイパー（2 症例）、米国および英国で摘発された従来型スクレイパー（各 1 症例）、実験感染従来型スクレイパー（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 マウスに脳内接種する。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}を検出する。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 法を用いて調べる。

（倫理面への配慮）

本実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会にて承認され、プリオンの取り扱いは、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症実験指針（平成 15 年 10 月）」を遵守する。遺伝子改変動物を用いた動物実験は組換え実験委員会ならびに動物実験委員会にて承認され、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月）」を遵守する。

C. 研究結果

1) L-BSE プリオン経口感染ウシ（#6781）の末梢組織における PrP^{Sc}の蓄積評価

PMCA の結果を表 1 に示す。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を除き、WB 法および PMCA 法のいずれの方法を用いても PrP^{Sc}は検出されなかった。回腸パイエル板では PMCA 法でのみ PrP^{Sc}が検出された。

経過観察中の L-BSE 感染ウシ脳乳剤（50g）経口投与ウシ（#9383）の唾液からは PMCA 法を用いても PrP^{Sc}は検出されなかった（表 2）。

2) 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

スクレイパーまたは CWD 感染脳乳剤を接種したマウスのうち、本報告書の作成時点でふらつき

等の神経症状を示す個体は認められない。引き続き経過観察を続ける。

D. 考察

L-BSE 感染脳乳剤の脳内接種試験の結果と同様に、経口感染ウシの一部の筋組織からも PMCA 法で PrP^{Sc}が検出されたことから、これらの組織に極微量の L-BSE プリオンが存在することが示唆された。また、回腸パイエル板からも PMCA 法で PrP^{Sc}が検出されたことから、L-BSE についても特定部位の除去は有効であることが示された。

経過観察中のウシ（#9383）の唾液からは PMCA 法を用いても PrP^{Sc}を検出することができなかったため、#9383 で経口感染が成立しているか否かは判定できず、解剖まで待つ必要がある。そのため、現時点で唾液を用いた生前診断の可否について結論付けることは適切でないと考える。

E. 結論

本年度は、L-BSE プリオン経口感染ウシの筋組織の一部および回腸パイエル板に極微量の PrP^{Sc}が蓄積することを PMCA 法により明らかにした。回腸遠位部は特定部位に指定され、と畜処理の工程で除去され、焼却処分されていることから、現在の BSE 対策は L-BSE のリスク管理措置としても有効であると考えられる。

F. 健康危険情報

これまでの研究成果で国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

ウシ番号 (投与後月数)	PMCA	延髄 門部	迷走神経 (頸部)	三叉神経節	坐骨神経	前腸間膜 神経節	星状神経節	交感神経幹	副腎
#6781 (88ヶ月)	R1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	R2								
	R3								
	R4								
	R5								
	R6								
	R7								
	R8								

ウシ番号 (投与後月数)	PMCA	上腕三頭筋	大腿四頭筋	大腰筋	最長筋	肋間筋	舌下腺	耳下腺	下顎腺
#6781 (88ヶ月)	R1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	R2								
	R3								
	R4								
	R5								
	R6								
	R7								
	R8								

ウシ番号 (投与後月数)	PMCA	回腸 パイエル板	耳下腺 リンパ節	下顎腺 リンパ節	外側咽頭 後リンパ節	扁桃	腸間膜 リンパ節
#6781 (88ヶ月)	R1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	R2						
	R3						
	R4						
	R5						
	R6						
	R7						
	R8						

表1 L-BSE 感染脳乳剤 (50 μg) を経口投与したウシ (#6781) の末梢組織における PrP^{Sc} 分布
各組織の PMCA は duplicate で実施した。R1~R4 の PMCA 産物の WB 法による PrP^{Sc} 確認は実施していない (NT)。黒の塗りつぶしは PrP^{Sc} 陽性、白抜きは陰性を示す。

PMCA	唾液 2018年4月	唾液 2018年9月	唾液 2018年年12月	唾液 2019年年4月	唾液 2019年9月	唾液 2019年12月
R1						
R2						
R3						
R4						
R5						
R6						
R7						
R8						

PMCA	唾液 2020年4月	唾液 2020年9月	唾液 2020年12月	陽性対照 (#5444)
R1				
R2				
R3				
R4				
R5				
R6				
R7				
R8				

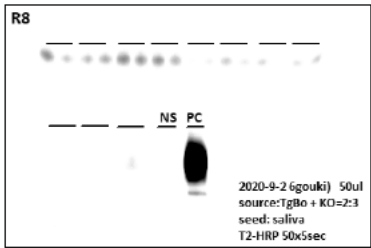


表2 L-BSE 感染脳乳剤 (50 μg) を経口投与し、経過観察中のウシ (#9383) の唾液からの PrP^{Sc} 検出
各組織の PMCA は duplicate で実施した。R1~R4 の PMCA 産物の WB 法による PrP^{Sc} 確認は実施していない (NT)。黒の塗りつぶしは PrP^{Sc} 陽性、白抜きは陰性を示す。