

# I. 総括研究報告書

令和2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, 2020)。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。本研究では、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) マウスPrPとシカPrPのキメラrMo/CerPrPを基質として用いることで、性状の異なる定型スクレイピープリオンを高感度・高精度に検出するReal-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) が構築できた。2) 異種間伝達を模した異種間Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) によりCWDおよびH-BSE感染脳乳剤からC-BSE様プリオンが出現することを確認した。従って、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に変化するリスクは無視できない。3) H-BSEプリオンを脳内接種したカニクイザルを、接種後4年10ヶ月および5年4カ月に安楽死して病理学的解析を行ったが、伝達を示す証拠は得られなかったことから、C-BSEおよびL-BSEと比較して、ヒトへの感染性は低いと考えられる。4) PMCA法を用いて、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PrP<sup>Sc</sup>が蓄積すること明らかにした。従って、回腸遠位部を特定部位として、と畜処理の工程で除去する現在の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。

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  
第1室室長)

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 主任研究員)

## 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, 2020)。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プリオン株の出現、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<sup>Sc</sup>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、ウエスタンブロットによりPrP<sup>Sc</sup>陰性が確認されたヒツジの延髄から作製したものをを使用した。

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。

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 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> の蓄積を Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) を用いて評価した。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<sup>Sc</sup> の検出を試みた。

### 2-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

H-BSE 接種群:2015 年 10 月 26 日に H-BSE 感染ウシの 10%脳乳剤 (20 µg 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) 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。

カニクイザルは定期的に、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、高次脳機能解析)、皮質脳波測定を実施した。

神経症状が一過性に認められた #25 において、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。

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の病理学的変化を解析した。

### 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) 異種間 PMCA によるヒトへの感染リスクを伴う株の出現

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。増幅した PMCA 産物について WB 法によりバンドパターンおよび PK 感受性の比較を行った。

### 3-2) 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)、非定型スクレイピー (2 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコル等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱いは、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1) 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 RT-QuIC の構築

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が、これら 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。

rMoPrP と rCerPrP のキメラ PrP8 種の有用性を検討した。使用した rMo/Cer キメラ PrP の中で、rCerN-MoPrP (N 末端から aa153 までが CerPrP、それ以降の C 末端側が MoPrP)、rCerN-Mo-CerCPrP (aa154～aa223 までが MoPrP) および rCerPrP-173S<sub>Mo</sub>/177N<sub>Mo</sub> (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<sub>Mo</sub>/177N<sub>Mo</sub> 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検出等の改良が必要である。

## 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<sup>Sc</sup> の蓄積評価

L-BSE プリオン経口感染ウシ (#6781) の末梢組織における PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> は検出されなかった。回腸パイエル板では PMCA のみ PrP<sup>Sc</sup> 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 法でも現在まで PrP<sup>Sc</sup> は検出されていない。

### 2-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの

## 病態解析

H-BSE を脳内 (2 頭) および経口 (2 頭) 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。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。また、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、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。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脳神経および扁桃、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は認められなかった。

### 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) 異種間 PMCA によるヒトへの感染リスクを伴う株の出現

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。TgBo 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 PK 抵抗性 PrP (PrPres) が増幅した。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 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 法によるバンドパターンが異なる 2 種類の PrPres が増幅した。そのうちのひとつは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。

### 3-2) 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

スクレイピーまたは 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。

## 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

定型スクレイピープリオンは 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、定型スクレイピープリオン検出用の RT-QuIC が構築できると思われる。

一方、非定型スクレイピ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ことから、さらなる検討が必要である。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かも知れない。

### 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> を検出することができなかつたため、#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。

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。しかし、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。

### 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

本年、異なる 4 検体の CWD から C-BSE 様プリオンが増幅したことから、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。

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

- 1) 定型スクレイピ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 rMo/CerPrP が有用であり、非感染脳乳剤存在下でもある程度の感度で性状の異なる定型スクレイピープリオンの存在を検出できることから、定型スクレイピープリオン検出用の RT-QuIC はほぼ構築できた。しかし、非定型スクレイピープリオンの高精度検出系の構築にはさらなる条件の検討が必要である。
- 2) 異種間伝達を模した異種間 PMCA により

CWD および H-BSE 感染脳乳剤から C-BSE 様プリオンが出現することが示された。従って、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は無視できないと考えられる。

- 3) H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルを、接種後 4 年 10 ヶ月、5 年 4 カ月に安楽死して病理学および生化学的解析を行ったが、伝達を示す証拠は得られなかったことから、C-BSE および L-BSE と比較して、ヒトへの感染性は低いと考えられる。
- 4) 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<sup>Sc</sup> 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

該当なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
各研究分担者の報告書を参照
2. 学会発表  
各研究分担者の報告書を参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし