

# 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