II. 分 担 研 究 報 告 書

１．各種動物プリオンを検出可能な RT-QuIC の基質の検討

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
分担研究者　佐藤　豊孝　北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授
分担研究者　青島　圭佑　北海道大学・大学院獣医学研究院・講師
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

Reat-Time Quaking-Induced Conversion（RT-QuIC）反応は、アミロイド seeding 活性の検出により、簡便かつ高感度に異常型プリオンタンパク質（PrP^{Sc}）を検出可能な方法である。その簡便性から、ヒトおよび動物のプリオン病の診断補助、動物プリオン病のモニタリング等に使用されている。これまでに、慢性消耗病（CWD）、非定型 BSE プリオン検出にはシカ組み換え PrP（rCerPrP）の使用により実用レベルの RT-QuIC が実施可能であることを報告してきた。一方、定型、非定型スクレイピー、および C-BSE プリオンの検出に使用可能な RT-QuIC 法は実用レベルには達していない。そこで、これらのプリオンの検出に適した組み換え PrP の同定を行った。令和 4 年度に報告したブタノール/メタノールを用いた一段階脂質除去法を組み合わせることで、C-BSE プリオン検出用として組み換えヒツジ PrP（rShPrP[ARQ]）、定型スクレイピープリオン検出用としてアミノ酸 173 と 177 をヒツジ型に置換した rCerPrP-173S/177N、非定型スクレイピープリオン検出用としてアミノ酸 98、173 および 177 をヒツジ型に置換した rCerPrP-98S/173S/177N が、RT-QuIC の基質として有用であった。これにより、CWD、定型および非定型 BSE、および定型および非定型スクレイピーの各種プリオンを検出可能な実用レベルの RT-QuIC 法が構築できた。

A．研究目的

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、2024 年に入り、英国 C-BSE の発生が報告されたように、C-BSE の病原体は地球上から根絶された訳ではない。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報告がある[1, 2]。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ており[3]、また、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が報告されている。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、C-BSE 様の病原体の再興への迅速対応を含め、動物プリオン病の迅速な診断と病原体の同定に必要である。

RT-QuIC 法は簡便かつ迅速高感度な PrP^{Sc} 検出法としてヒトおよび動物のプリオン病の診断補助、動物プリオン病のモニタリング等に使用されている。しかし、RT-QuIC 反応は阻害物質による影響を受けやすく、反応液中に含まれる組織乳剤の濃度が高いと反応は阻害される。この点が改善できれば、RT-QuIC 法の汎用性は高まり、ウエスタンブロット法や免疫組織化学に替わる方法として、モニタリング実施機関の一元化などにも対応可能となる。

CWD と非定型 BSE（A-BSE）プリオンを検出する RT-QuIC は実用レベルに到達している[4]。一方、C-BSE、定型スクレイピー（C-Scrapie）、および非定型スクレイピー（A-Scrapie）の各プリオンを検出する RT-QuIC は実用レベルに達しておらず、改良の余地がある。そこで、本年度は、C-BSE、C-および A-Scrapie を検出する実用レベルの RT-QuIC を確立するために、最適な rPrP を調べるとともに、令和 4 年度に報告したブタノール/メタノールを用いた一段階脂質除去法を組み合わせて、これらの動物プリオンを実用レベルで検出する RT-QuIC の確立を行った。

B．研究方法

1）プリオン感染試料

C-BSE として Wakayama 株、英国から輸入した非定型スクレイピーを動物衛生研究所でヒツジで継代したもの、C-Scrapie として日本で発生した B3, G1, KH2, S2, S3, Y5 を使用した。

2）RT-QuIC 法

基質として、マウスプリオンの検出には組換え rMoPrP（マウス）、rHaPrP（ハムスター）、rBvPrP（バンクボール）、rBoPrP（ウシ）、rCerPrP（シカ）、rShPrP（ヒツジ）-ARQ、アミノ酸 173 と 177 をヒツジ型に置換した rCerPrP-173S/177N、非定型スクレイピープリオン検出用としてアミノ酸 98、173 および 177 をヒツジ型に置換した rCerPrP-98S/173S/177N を用いた。反応液は 25 mM PIPES, 10 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, 100 μM EDTA, 10 μM チオフラビン (ThT) を基本とした。プレートリーダとして TECAN F200 を用いる場合は、攪拌スピードは 432 rpm とした。BGM FLUOstar Omega を用いる場合は、8 の字回転（dual orbital）を用い、500 から 1,000 rpm で攪拌した。96 well optical bottom plate（Thermo Fisher）を使用し、下方測定により蛍光を測定した。

3）脳乳剤の有機溶剤処理

2%各種動物脳乳剤は、20 倍量のブタノール/メタノール（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（Löfgren et al., 2012）[4]。沈殿物は元の脳乳剤と等量の PBS に懸濁して、RT-QuIC 用試料とした。反芻動物の脳乳剤は、20〜40 倍量の Bu/Me (3:1) と混和して、同様の操作により、脂質を除去した RT-QuIC 用試料とした。

（倫理面への配慮）

該当なし。

C．研究結果

1) 各種動物プリオンの検出に最適な rPrP の同定

プリオン感染動物の脳乳剤を PBS で希釈した試料から、高感度に各プリオンを検出可能な rPrP を選抜した。その結果、rShPrP-ARQ、rCerPrP-173S/177N、rCerPrP-98S/173S/177N ともに C-BSE プリオンを高感度に検出できた。C-Scrapie プリオンについては rCerPrP-173S/177N と rCerPrP-98S/173S/177N が、A-scrapie プリオンについては rShPrP-ARQ と rCerPrP-98S/173S/177N が、高感度に検出できた。しかし、0.1%脳乳剤存在下では、C-BSE プリオンの検出は完全に阻害された。C-scrapie プリオンの検出感度は 10^2〜10^4 低下した。A-scrapie プリオンの検出感度は rShPrP-ARQ では 10^4 程度低下したが、rCerPrP-98S/173S/177N を用いた場合は検出限界には差が認められなかったが、反応が陽性となるまでの時間（Lag-phase）が長くなる傾向が認められた。そこで、Bu/Me による脂質抽出による反応の回復を調べた。C-BSE プリオンの検出では、rShPrP-ARQ を用いたときの回復が最も良く、PBS 希釈の検出限界と同じレベルまで回復した。C-Scrapie プリオンの検出では rCerPrP-173S/177N と rCerPrP-98S/173S/177N ともに PBS 希釈の検出限界と比較して 10^{-1} の感度まで反応が回復した。A-Scrapie プリオンの検出では rCerPrP-98S/173S/177N を用いた場合、検出限界および Lag-phase が PBS 希釈と同程度に回復した（図 1）。従って、C-BSE プリオンの検出には rShPrP-ARQ、C-Scrapie プリオンの検出には rCerPrP-173S/177N もしくは rCerPrP-98S/173S/177N、A-Scrapie プリオンの検出には rCerPrP-98S/173S/177N が適していることが判明した。

2) C-Scrapie 株の検出

C-Scrapie プリオンには生物性状が異なる株が存在することから、日本で発生した C-Scrapie のうち、マウスへの伝達性、PrP^{Sc} のタンパク質分解酵素抵抗性の違いから、生物性状あるいは生化学性状が異なる C-Scrapie プリオンの検出感度を調べた [5]。その結果、株により差はあるものの、rCerPrP-173S/177N および rCerPrP-98S/173S/177N ともに、PBS 希釈の検出限界と比較して、Bu/Me による脂質抽出後に、PBS 希釈と同定度まで検出限界が回復、あるいは 10^{-1} 程度まで検出限界が回復した（図 2）。脳乳剤に存在する PrP^{Sc} の量と比較すると、PBS 希釈時の検出限界が Y5 や KH2 のように 10^9 程度のものと B3 のように 10^6 程度のものと、大きく異なる試料が存在することから、C-Scrapie は試料によって検出感度が異なることを考慮する必要がある。

D．考察

本年度は、懸案となっていた C-BSE、A-Scrapie、および C-Scrapie プリオンの検出を、実用レベルで可能とする RT-QuIC を構築できた。これまでに構築済みの CWD および A-BSE プリオン検出用の RT-QuIC では rCerPrP が有用であったが、各々のプリオンを高感度に検出可能な rPrP を同定することで、C-BSE、A-Scrapie、および C-Scrapie プリオン検出用の RT-QuIC が確立できた。一つの基質に特定することはできないが、rCerPrP、rShPrP-ARQ 、 rCerPrP-173S/177N 、 および rCerPrP-98S/173S/177N の 4 種の rPrP を用いることで、CWD、A-BSE、C-BSE、A-Scrapie、および C-Scrapie を実用レベルの検出感度で検出可能な RT-QuIC 法が構築できた（図 3）。ここで言う実用レベルとは、脳乳剤の PBS 単純希釈で 10^{-7} 以上の感度を有し、0.1%脳乳剤存在下では、必要に応じて Bu/Me を用いた脂質除去を組み合わせることで、PBS 単純希釈と同等の感度もしくは 10^{-1} の感度で標的とするプリオンを検出可能という条件である。脳内に微量に存在するプリオンを RT-QuIC 検出するためには、アッセイ条件中の最高濃度の脳乳剤（0.1%）存在下での検出限界を考慮する必要があるが、今回見出した条件は、この条件を満たしている。

生物・生化学性状が異なる C-Scrapie プリオンの検出は、存在する PrP^{Sc} 量と比べて、RT-QuIC の検出限界が大きく異なる株が存在したが、B3 以外の株は実用レベルで検出が可能であった。A-Scrapie および C-Scrapie ともに、さらに異なる検体での検出感度を精査する必要はあるが、今回、各種動物プリオンを実用レベルで検出可能な RT-QuIC のプロトタイプが確立できたと思われる。

E．結論

rShPrP-ARQ 、 rCerPrP-173S/177N 、 および rCerPrP-98S/173S/177N の 4 種の rPrP を用いることで、C-BSE、A-Scrapie、および C-Scrapie を実用レベルの検出感度で検出可能な RT-QuIC 法が構築できた。これまでの結果成果と合わせると、CWD、C-および A-BSE、および C-および A-スクレイピーの各種プリオンを検出可能な実用レベルの RT-QuIC 法が揃ったことになる。

<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. Löfgren L, Ståhlman M, Forsberg GB, Saarinen S, Nilsson R, Hansson GI. The BUME method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. ***J Lipid Res***. 2012, 53(8):1690-700. doi: 10.1194/jlr.D023036

5. 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):3421-3426. doi: 10.1128/JCM.40.9.3421-3426

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

1. 論文発表

1) Erdenebat T, Komatsu Y, Uwamori N, Tanaka M, Hoshika T, Yamasaki T, Shimakura A, Suzuki A, Sato, T, Horiuchi M. Excitatory neuron-prone prion propagation and excitatory neuronal loss in prion-infected mice. ***Front Mol Neurosci***, 2024, 17: 1498142, 2024. doi: 10.3389/fnmol.2024.1498142. eCollection 2024

2. 学会発表

1) Horiuchi M, Hoshika T, Temuulen E, Sato T., Suzuki A. Excitatory neuron-tropism of prion propagation and involvement of stress-induced transcription factor ATF3 in neuropathobiology of prion-infected mice., Prion2024, Oct 24-27, Nanchang, China

2) Suzuki A, Sawada K, , Nakashima T, Komatsu Y, Sato T, and Horiuchi M. Establishment of practical method for the detection of major animal prions using real-time quaking-induced conversion. Asian Pacific Prion Symposium 2024, Nov 30-Dec 1, Sapporo, Japan.

3) Hoshika T, Komatsu Y, Temuulen E, Suzuki A, Akagi A, Miyahara H, Iwasaki Y, Sato T, and Horiuchi M.__Expression of stress-induced transcriptional regulator ATF3 in brains of patients

4) Horiuchi M, Suzuki A, Sato T, Erdenebat T, Hoshika T. PrPSc-specific staining in primary neuronal and astrocytic cultures. Asian Pacific Prion Symposium 2024, Nov 30-Dec 1, Sapporo, Japan

5) Horiuchi M, Hoshika T, Temuulen E, Sato T., Suzuki A. Involvement of stress-induced transcription factor ATF3 in neuropathobiology of prion diseases and excitatory neuron-tropism of prion propagation. The 12th Meeting of the Consortium for the Control of Zoonoses. Dec 2-3, 2024, Sapporo, Japan

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

Seed	rPrP	Dilu-ent	Extrac-tion	Lag phase (h)						End-point
				10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
C-BSE	CerPrP-173S/177N	PBS	–	18.6 ± 4.8 (6/9)	26.3 ± 5.2 (9/9)	37.9 ± 9.2 (4/9)	47.4 ± 16.2 (3/9)	51.2 (1/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}
		Bo NBH	–	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	$>10^{-4}$
			+	26.2 ± 3.6 (9/9)	34.6 ± 6.4 (9/9)	43.5 ± 8.1 (8/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-6}
	CerPrP-98S/173S/177N	PBS	–	59.8 (1/9)	25.9 ± 3.5 (9/9)	33.6 ± 7.7 (9/9)	47.3 ± 11.2 (3/9)	41.3 ± 3.6 (2/9)	57.8 (1/9)	$<10^{-9}$
		Bo NBH	–	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	$>10^{-4}$
			+	25.8 ± 3.8 (9/9)	41.8 ± 8.5 (8/9)	49.2 ± 10.2 (7/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-6}
	ShPrP (ARQ)	PBS	–	30.7 ± 5.9 (9/9)	32.9 ± 3.0 (9/9)	44.7 ± 9.4 (4/9)	34.8 (1/9)	54.0 (1/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}
		Bo NBH	–	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	$>10^{-4}$
			+	29.7 ± 5.2 (9/9)	39.3 ± 8.3 (9/9)	49.2 ± 9.6 (5/9)	52.0 ± 6.7 (2/9)	56.3 (1/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}

Seed	rPrP	Dilu-ent	Extrac-tion	Lag phase (h)						End-point
				10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
C-Scrapie (Y5)	CerPrP-173S/177N	PBS	–	10.2 ± 1.9 (9/9)	12.8 ± 3.4 (9/9)	19.2 ± 5.3 (9/9)	29.2 ± 9.0 (9/9)	42.9 ± 5.4 (2/9)	49.7 ± 12.9 (2/9)	$<10^{-9}$
		Sh NBH	–	31.3 ± 9.1 (9/9)	45.3 ± 9.9 (5/9)	42.8 (1/9)	51.0 (1/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-7}
			+	18.4 ± 4.2 (9/9)	29.2 ± 6.9 (9/9)	40.4 ± 5.5 (9/9)	47.6 ± 6.0 (2/9)	49.6 ± 7.1 (3/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}
	CerPrP-98S/173S/177N	PBS	–	15.7 ± 14.1 (9/9)	11.1 ± 1.8 (9/9)	15.5 ± 2.7 (9/9)	25.6 ± 4.4 (9/9)	45.8 ± 8.7 (6/9)	45.3 ± 11.5 (3/9)	$<10^{-9}$
		Sh NBH	–	42.2 ± 8.3 (4/9)	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10^{-4}
			+	17.4 ± 3.9 (9/9)	28.4 ± 6.8 (9/9)	38.5 ± 8.0 (9/9)	48.2 ± 10.4 (4/9)	46.5 ± 3.1 (2/9)	>60.0	10^{-8}
	ShPrP (ARQ)	PBS	–	16.9 ± 1.4 (9/9)	16.2 ± 4.4 (9/9)	33.3 ± 16.5 (9/9)	52.3 ± 5.9 (4/9)	56.2 (1/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}
		Sh NBH	–	36.7 ± 16.0 (9/9)	37.5 ± 10.2 (8/9)	45.0 ± 11.3 (3/9)	50.1 ± 12.6 (2/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-7}
			+	41.1 ± 9.7 (9/9)	44.4 ± 8.4 (9/9)	49.3 ± 1.9 (3/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-6}

Seed	rPrP	Dilu-ent	Extrac-tion	Lag phase (h)						End-point
				10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
A-scrapie	CerPrP-173S/177N	PBS	–	50.5 ± 6.1 (9/9)	46.4 ± 4.1 (9/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-5}
		Sh NBH	–	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	$>10^{-4}$
			+	58.3 (1/9)	55.8 (1/9)	>60.0 (0/9)	54.8 ± 0.1 (2/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-7}
	CerPrP-98S/173S/177N	PBS	–	30.4 ± 3.7 (9/9)	24.5 ± 2.9 (9/9)	49.8 ± 4.5 (7/9)	45.9 ± 7.8 (4/9)	42.9 ± 7.0 (3/9)	53.3 (1/9)	$<10^{-9}$
		Sh NBH	–	48.1 ± 6.7 (8/9)	46.0 ± 7.3 (9/9)	49.6 ± 5.6 (7/9)	49.6 ± 7.7 (7/9)	50.5 ± 5.9 (6/9)	56.2 (1/9)	$<10^{-9}$
			+	34.3 ± 4.0 (9/9)	36.3 ± 3.9 (9/9)	36.1 ± 3.7 (9/9)	38.7 ± 6.1 (9/9)	40.1 ± 5.8 (7/9)	48.3 ± 5.8 (3/9)	$<10^{-9}$
	ShPrP (ARQ)	PBS	–	32.2 ± 6.8 (9/9)	33.8 ± 10.8 (8/9)	43.1 ± 3.0 (4/9)	46.7 ± 3.3 (2/9)	42.8 ± 10.5 (2/9)	44.1 ± 7.6 (2/9)	$<10^{-9}$
		Sh NBH	–	56.3 (1/9)	54.2 (1/9)	>60.0 (0/9)	57.8 (1/9)	52.2 (1/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}
			+	52.9 ± 7.3 (2/9)	51.0 (1/9)	44.2 (1/9)	51.1 ± 3.0 (2/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-7}

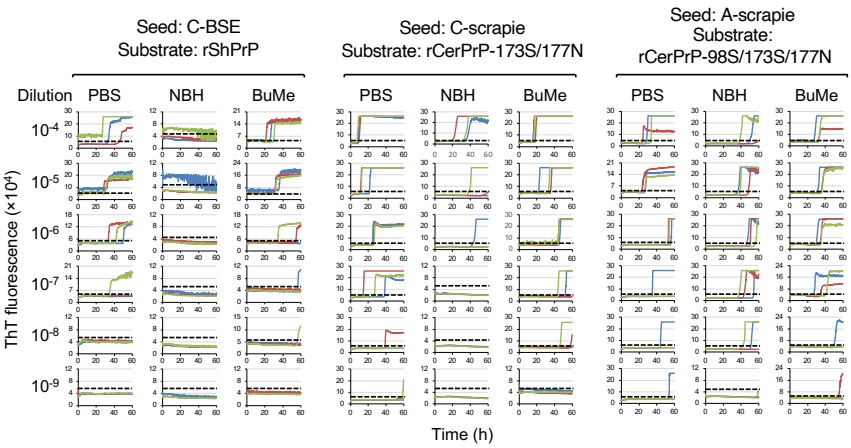


図 1. C-BSE, C-および A-Scrapie プリオンの検出に適した基質の選抜。
（表）基質として rShPrP-ARQ、rCerPrP-173S/177N、rCerPrP-98S/173S/177N を使用した。表は、各希釈毎の Lag-phase（平均±標準偏差）、括弧内は供試ウェル数中の陽性ウェル数を示す。PBS：PBS によりシードとなる感染動物脳乳剤を希釈したもの（単純希釈）。NBH：0.1%脳乳剤でシードとなる感染動物脳乳剤を希釈したもの。Extraction +は、Bu/Me により脂質抽出を実施したもの。蛍光の検出は BMG FLUOstar Omega で行い、rCerPrP-173S/177N および rCerPrP-98S/173S/177N 使用時の震盪条件は double orbital 700 rpm、rShPrP 使用時は single orbital 800 rpm。
（グラフ）C-BSE プリオンを rShPrP-ARQ、C-Scrapie プリオンを rCerPrP-173S/177N、A-Scrapie を rCerPrP-98S/173S/177N、で検出した時の増幅曲線。PBS は単純希釈、NBH は 0.1%非感染脳乳剤存在下、BuMe は、0.1%非感染脳乳剤で希釈した試料（NBH）を Bu/Me で脂質抽出後の試料。

rCerPrP-173S/177N

Seed	Dilu-ent	Extrac-tion	Lag phase (h) 10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	End-point
B3	PBS	–	29.4 ± 3.4 (3/3)	27.3 ± 3.2 (3/3)	44.1 ± 6.5 (3/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	$>10^{-4}$
		+	34.8 ± 6.1 (3/3)	47.3 ± 2.3 (3/3)	56.4 ± 6.2 (3/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
G1	PBS	–	38.4 ± 19.0 (3/3)	19.9 ± 1.5 (3/3)	27.0 ± 2.8 (3/3)	54.1 (1/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-7}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	$>10^{-4}$
		+	24.8 ± 0.6 (3/3)	36.2 ± 13.3 (3/3)	50.3 ± 12.1 (2/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
KH2	PBS	–	11.5 ± 3.7 (3/3)	9.2 ± 1.6 (3/3)	11.8 ± 2.2 (3/3)	17.4 ± 1.9 (3/3)	43.4 (1/3)	>60.0 (0/3)	10^{-8}
	Sh NBH	–	33.4 ± 2.4 (3/3)	29.2 ± 5.7 (3/3)	39.2 ± 4.9 (2/3)	51.5 (1/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-7}
		+	14.7 ± 0.2 (3/3)	16.6 ± 1.8 (3/3)	24.9 ± 1.0 (3/3)	29.0 (1/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-7}
S2	PBS	–	24.9 ± 5.0 (3/3)	26.3 ± 3.4 (3/3)	24.3 ± 5.2 (3/3)	58.4 ± 2.7 (2/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-7}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	$>10^{-4}$
		+	31.4 ± 2.3 (3/3)	50.9 ± 5.6 (3/3)	53.6 ± 2.6 (2/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
S3	PBS	–	36.4 ± 8.1 (3/3)	20.4 ± 3.0 (3/3)	28.4 ± 3.5 (3/3)	47.2 ± 5.4 (2/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-7}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-4}
		+	25.1 ± 6.6 (3/3)	38.5 ± 7.7 (3/3)	39.5 ± 20.8 (2/2)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
Y5	PBS	–	10.2 ± 1.9 (9/9)	12.8 ± 3.4 (9/9)	19.2 ± 5.3 (9/9)	29.2 ± 9.0 (9/9)	42.9 ± 5.4 (2/9)	49.7 ± 12.9 (2/9)	$<10^{-9}$
	Sh NBH	–	31.3 ± 9.1 (9/9)	45.3 ± 9.9 (5/9)	42.8 (1/9)	51.0 (1/9)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-7}
		+	18.4 ± 4.2 (9/9)	29.2 ± 6.9 (9/9)	40.4 ± 5.5 (9/9)	47.6 ± 6.0 (2/9)	49.6 ± 7.1 (3/9)	>60.0 (0/9)	10^{-8}

rCerPrP-98S/173S/177N

Seed	Dilu-ent	Extrac-tion	Lag phase (h) 10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	End-point
B3	PBS	–	25.5 ± 4.4 (3/3)	23.4 ± 3.9 (3/3)	54.3 ± 3.5 (3/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	$>10^{-4}$
		+	31.1 ± 2.0 (3/3)	36.5 ± 4.0 (3/3)	52.7 (1/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
G1	PBS	–	23.7 ± 1.8 (3/3)	18.2 ± 1.9 (3/3)	31.1 ± 3.2 (3/3)	58.2 (1/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (30/9)	10^{-7}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	$>10^{-4}$
		+	29.3 ± 3.8 (3/3)	37.2 ± 3.1 (3/3)	43.8 ± 6.4 (2/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
KH2	PBS	–	9.5 ± 1.5 (3/3)	8.4 ± 1.3 (3/3)	10.9 ± 0.9 (3/3)	20.5 ± 6.6 (3/3)	44.3 ± 18.4 (2/3)	>60.0 (0/3)	10^{-8}
	Sh NBH	–	32.8 ± 7.0 (3/3)	30.2 ± 3.7 (2/3)	37.4 ± 0.1 (2/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-6}
		+	11.1 ± 0.9 (3/3)	11.7 ± 1.1 (3/3)	33.1 ± 3.1 (3/3)	35.3 ± 0.6 (2/3)	>60.0 (0/9)	>60.0 (0/9)	10^{-7}
S2	PBS	–	27.3 ± 3.8 (3/3)	22.1 ± 0.7 (3/3)	26.9 ± 1.9 (3/3)	49.4 ± 9.7 (3/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	10^{-7}
	Sh NBH	–	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	>60.0 (0/3)	$>10^{-4}$
		+	30.1 ± 4.5 (3/3)	44.0 ± 9.7 (3/3)	41.4 ± 10.5 (2/3)	>60.0 (0/3)	34.0 (1/3)	>60.0 (0/3)	10^{-8}
S3	PBS	–	NT						
	Sh NBH	–	NT						
		+	NT						
Y5	PBS	–	15.7 ± 14.1 (9/9)	11.1 ± 1.8 (9/9)	15.5 ± 2.7 (9/9)	25.6 ± 4.4 (9/9)	45.8 ± 8.7 (6/9)	45.3 ± 11.5 (3/9)	$<10^{-9}$
	Sh NBH	–	42.2 ± 8.3 (4/9)	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	>60.0	10^{-4}
		+	17.4 ± 3.9 (9/9)	28.4 ± 6.8 (9/9)	38.5 ± 8.0 (9/9)	48.2 ± 10.4 (4/9)	46.5 ± 3.1 (2/9)	>60.0	10^{-8}

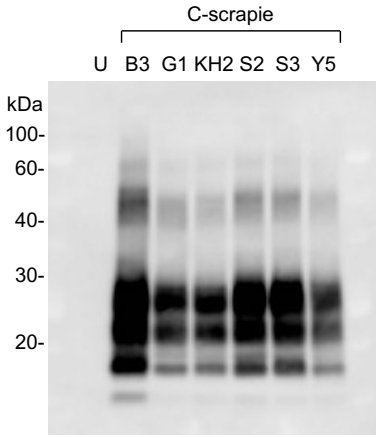


図２．各種 C-Scrapie 試料からのプリオンの検出。
日本で摘発されたスクレイピー（G1, KH2, S2, S3, Y5）および実験感染のスクレイピー（B3）を使用した。右は試料中の PrP^{Sc} をウエスタンブロットにより検出したもの。左上段は rCerPrP-173S/177N、下段は rCerPrP-98S/173S/177N を使用した。表は、各希釈毎の Lag-phase（平均±標準偏差）、括弧内は供試ウェル数中の陽性ウェル数を示す。PBS：PBS によりシードとなる感染動物脳乳剤を希釈したもの（単純希釈）。NBH は 0.1%脳乳剤でシードとなる感染動物脳乳剤を希釈したもの。Extraction +は、Bu/Me により脂質抽出を実施したもの。蛍光の検出は BMG FLUOstar Omega で行い、震盪条件は double orbital 700 rpm。

Specific amino acids Capital: Cer *Italic: Sh*	rPrP	Efficiency for RT-QuIC substrate			Reactivity in the presence of NBH		Recovered reactivity after lipid extraction	
		Good	Moderate	Poor	Moderate	Severe	Good	Moderate
rShPrP (ARQ)	98 173 208 25-*S* *S N I*-233 177	C-scrapie	C-BSE, A-scrapie		C-scrapie	C-BSE, A-scrapie	C-BSE	C-scrapie, A-scrapie
rCerPrP-173S/177N	98 173 208 25-T *S N*M-233 177	C-scrapie C-BSE		A-scrapie	A-scrapie	C-BSE, C-scrapie	C-scrapie	C-BSE, A-scrapie
rCerPrP-98S/173S/177N	98 173 208 25-*S* *S N*M-233 177	C-scrapie	C-BSE, A-scrapie		A-scrapie	C-BSE, C-scrapie	C-scrapie, A-scrapie	C-BSE

図３．C-BSE, C-および A-Scrapie プリオンの検出に適した基質の選抜。
Efficiency for RT-QuIC substrate は PBS の単純希釈における検出限界と Lag-phase から以下のように判定した。
Good: 検出限界が 10^{-8} 以上で、10^{-4} と 10^{-5} 希釈における Lag-phase が 30 時間以下
Moderate: 検出限界が 10^{-8} 未満、あるいは 10^{-4} と 10^{-5} 希釈における Lag-phase が 30 時間より長い
Poor: 検出限界が 10^{-7} 未満、あるいは 10^{-4} と 10^{-5} 希釈における Lag-phase が 40 時間より長い

Reactivity in the presence of NBH は 0.1%非感染脳乳剤による希釈列における検出限界と Lag-phase から以下のよう判定した。
Moderate: 検出限界の比 (PBS 希釈のエンドポイント/NBH 存在下でのエンドポイント)が 10^{-2} から 10^{-3}、もしくは 10^{-5} 希釈で Lag-phase が 10〜25 時間延長
Severe: 検出限界の比 10^{-3} 未満、もしくは 10^{-5} 希釈で Lag-phase が 25 時間以上延長。

Recovered reactivity after lipid extraction は 0.1%非感染脳乳剤による希釈列から BuMe による脂質抽出後の試料における検出限界と Lag-phase から以下のように判定した。
Good: 検出限界が 10^{-8} 以上で 10^{-4} と 10^{-5} 希釈における Lag-phase が 20 時間以下
Moderate, 10^{-4} と 10^{-5} 希釈における Lag-phase の差が 20 時間未満

2. BSE 経口感染牛の病態解析とウイルス感染による異常プリオン蛋白質生成リスク評価

分担研究者　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
研究協力者　宮澤　光太郎　（農研機構動物衛生研究部門・人獣共通感染症研究領域）
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

我々はこれまで、定型 BSE、非定型 BSE 感染ウシ脳乳剤を用いた、ウシへの経口接種実験を行ってきた。ウシへの BSE 感染成立の判定には、ウエスタンブロット（WB）法を用い、脳幹部に蓄積した異常プリオン蛋白質を検出してきた。本研究では、WB 法で陰性と判定された経口接種牛の脳幹部を、より高感度な試験管内異常プリオン蛋白質増幅系を用いて再検査し、異常プリオン蛋白質蓄積の有無を検証する。一方、近年ウイルスが感染した細胞において、異常プリオン蛋白質が生成される可能性が報告された。マウス由来培養細胞あるいはウシ由来培養細胞へ感受性のあるウイルス感染を行い、異常型プリオン蛋白質の生成・蓄積が生じるか、試験管内異常プリオン蛋白質増幅系を用いて検証を行う。

A．研究目的

我々はこれまで、定型 BSE、非定型 BSE 感染ウシ脳乳剤を用い、同種であるウシへの経口接種実験を行ってきた。ウシへの BSE 伝達成立の判定には、ウエスタンブロット（WB）法を用い、脳幹部に蓄積した異常プリオン蛋白質を検出してきた。本研究では、WB 法で陰性と判定された経口接種牛の脳幹部を、より高感度な試験管内異常プリオン蛋白質増幅系を用いて再検査し、シード活性を指標に異常プリオン蛋白質蓄積の有無を検証する。これを第一の研究目的とする。

一方、近年ウイルス感染した細胞において、異常プリオン蛋白質が生成される可能性が報告された。マウス由来培養細胞あるいはウシ由来培養細胞へ感受性のあるウイルス感染を行い、異常型プリオン蛋白質の生成・蓄積が生じるか、試験管内異常プリオン蛋白質増幅系を用いて検証を行う。これを第二の研究目的とする。

B．研究方法

1）定型 C-BSE 感染ウシ脳乳剤（5 グラム）を経口投与したウシ（計 29 頭）のうち、解剖後に脳幹部から異常型プリオン蛋白質を WB 法で検出されなかった 20 頭の脳幹部、脊髄頚部、脊髄腰部組織を用いて、Protein Misfolding Cyclic Amplification（PMCA）法で異常プリオン蛋白質の検出を試みる。PMCA 法の基質には、ウシ正常プリオン蛋白質発現トランスジェニックマウス（TgBov）の脳乳剤を用いる。各検体は四つ組で、PMCA 法に供する。

2）ウイルス感染による異常プリオン蛋白質生成リスク評価

ウシ腎臓由来 MDBK 細胞に牛プリオン蛋白質（PrP）を過発現させ、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）非細胞病原性株を感染させる。長期培養後、ウイルス力価を測定する。細胞を回収し、異常型プリオン蛋白質蓄積の解析用に保存する。PMCA 法を用いて、ウイルス感染細胞溶解液中の異常プリオン蛋白質の検出を試みる

（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）BSE プリオン経口感染ウシの脳幹部、脊髄頚部、脊髄腰部におけるシード活性の蓄積評価

BSE 脳乳剤を経口投与後、解剖したウシにおける BSE プリオン伝達成立の有無は、脳幹部から異常プリオン蛋白質を WB 法で検出することで判定していた。WB 法で異常プリオン蛋白質を検出できなかった、C-BSE 脳乳剤経口投与ウシの各脳幹部、脊髄頚部、脊髄腰部検体を用い、高感度の PMCA 法により異常プリオン蛋白質の再検索を行った。その結果 C-BSE 経口投与ウシで 20 頭中 8 頭から、異常プリオン蛋白質が検出された（表）。前年度の報告では、H-BSE 50g 経口投与牛(#1154 , 12 mpi) において、脳幹部からシード活性が検出された。しかし、今年度の解析では、この牛の脊髄からシード活性は検出されず、また脳幹部を用いた再試験でも再現性を得ることができなかった。

２）ウイルス感染による異常プリオン蛋白質生成リスク評価

ウシ腎臓由来の MDBK 細胞に、牛 PrP を過発現させ、薬剤選択により安定発現細胞株を 5 株樹立した。細胞に BVDV 感染させ、継代せずに 1 か月間培養を行った（図）。培養上清から感染性のあるウイルスを検出することで、持続感染状態を確認した。これらの細胞株から WB 法と PMCA 法により、異常プリオン蛋白質検出を試みたが、検出されなかった。安定細胞株樹立の際に行ったクローニングにより、プリオン非感受性細胞が選択された可能性を考え、牛 PrP を過発現させた MDBK 細胞をクローニングせずに BVDV を 1 か月間持続感染させた。この細胞から WB 法と PMCA 法により、異常プリオン蛋白質検出を試みたが、検出されなかった。

D．考察

解析により、試験に供した C-BSE プリオン経口投与ウシ 20 頭のうち、8 頭から PMCA 法で異常プリオン蛋白質が検出された。四つ組検体中、1～2 検体のみ陽性となる検体があり、これらの検体では異常プリオン蛋白質の検出開始される継代数も高かった。このことから、これら経口投与ウシの脳幹における異常プリオン蛋白質の蓄積は、微量であることが考えられた。今後、疑陽性の可能性も考慮に入れ、シード活性が 1 組織のみ陽性であった検体に関しては、複数回 PMCA 用による再試験を行う。

ウシ PrP 発現 MDBK 細胞に、BVDV を 1 か月間持続感染することができた。しかし、持続感染細胞から、異常プリオン蛋白質を検出できなかった。感染細胞内で BVDV は、PrP が局在する脂質ラフトに存在しないという報告があり、両者が相互作用する機会がないため、異常プリオン蛋白質の生成や蓄積が生じない可能性が考えられた。

E．結論

本年度は、WB 法で陰性と判断された C-BSE 経口投与ウシ 20 頭中 8 頭において、脳幹部、脊髄頚部、脊髄腰部のいずれから、高感度試験管内異常プリオン蛋白質増幅系である PMCA 法により、異常プリオン蛋白質が検出された。BVDV を持続感染させた、ウシ PrP 発現 MDBK 細胞では、異常プリオン蛋白質の蓄積は認められなかった。

F．健康危険情報

これまでの研究成果で国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報はない。

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

個体番号		5604	5536	1936	1945	1952	6416	8104	8906	9787	4008
感染後経過月		8	18	20	20	20	24	24	24	30	30
WB（脳幹・脊髄）		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PMCA	脳幹部	+(3/4, R3)	–	+(1/4, R3)	+(4/4, R4)	–	–	–	–	–	–
	脊髄頚部	–	–	+(1/4, R4)	+(4/4, R4)	–	–	–	–	–	–
	脊髄腰部	+(1/4, R3)	–	–	+(4/4, R4)	–	–	–	–	–	–

個体番号		7342	2072	5529	5543	5598	5581	5505	5567	5475	5420
感染後月		30	30	36	36	46	48	48	48	48	60
WB（脳幹・脊髄）		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PMCA	脳幹部	–	–	–	+(4/4, R2)	+(4/4, R2)	–	–	+(3/4, R3)	–	–
	脊髄頚部	–	–	+(1/4, R4)	+(1/4, R3)	+(4/4, R2)	–	–	+(2/4, R3)	–	–
	脊髄腰部	+(1/4, R4)	–	–	+(3/4, R3)	+(4/4, R2)	–	–	+(4/4, R3)	–	–

表 1　C-BSE 脳乳剤経口投与ウシ組織からの PMCA 法による異常プリオン蛋白質検出

ウシ個体番号、感染後経過月、WB と PMCA の結果を示す。括弧内は、（陽性検体数/四つ組検体, 陽転 PMCA ラウンド数）を表す

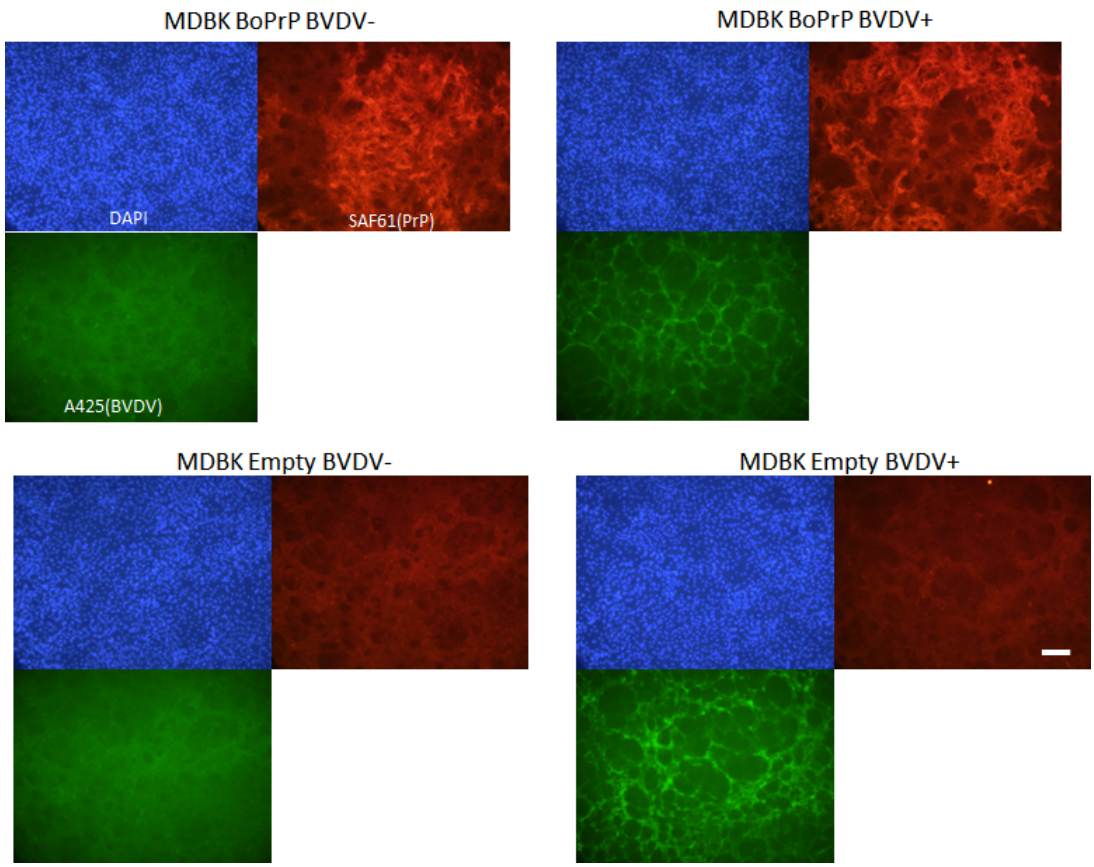


図　牛 PrP 発現細胞における各抗原の免疫細胞化学

細胞核（青）、PrP（赤）、BVDV ウイルス抗原（緑）が示されている

3. 非定型 BSE 感染サルのプリオン体内分布の解析 Shaking 法によるプリオン増幅

分担研究者　今村　守一　宮崎大学医学部医学科感染症学講座微生物学分野
研究協力者　新　竜一郎　宮崎大学医学部医学科感染症学講座微生物学分野

研究要旨

本年度は、以下の 2 つの研究成果を報告する。１つ目の研究では、昨年度までに、試験管内プリオン増幅法（PMCA 法）を用いて L 型 BSE　(L-BSE)プリオンを経口接種したカニクイザルの神経系やリンパ系組織等にプリオンが存在することを示唆する結果を得ていた。今年度は、これらの組織に蓄積したプリオンの生化学的性状解析を行った。その結果、蓄積したプリオンは接種源である L-BSE プリオンとは異なり、定型 BSE (C-BSE)プリオンに極めて類似した性状を示すことが明らかになった。２つ目の研究では、振盪のみを用いたプリオンの試験管内増幅の可能性について検討し、PMCA 法に代わる新たな手法としての有効性について評価した。

Ａ．研究目的

L 型牛海綿状脳症(L-BSE)の経口感染によるヒトへの感染リスクについては、現在に至るまで明確な結論が得られていない。本課題では、L-BSE プリオンを経口的に接種したヒトモデル動物であるカニクイザルにおいて、感染が成立しているか否かを明らかにすることを目的として研究を進めてきた。これまでに我々は、PMCA（Protein Misfolding Cyclic Amplification）法を用いることで、L-BSE 経口接種サルの中枢神経系やリンパ系組織において、プリオンの存在を示唆する知見を得てきた。本年度は、これらのサル組織に蓄積したプリオンの生化学的性状について、より詳細な解析を実施した。

また、本課題では、極微量のプリオン検出に加え、異種間プリオン伝播やプリオンの自発生成の試験管内再現を目的として、PMCA 法を主要な手法として用いている。しかしながら、PMCA 法には高価なソニケーターを必要とする点や、1 回の反応に供試可能な検体数に限りがある点など、実用面での制約が存在する。そこで本年度は、より簡便で多検体処理が可能な手法として、機械的振盪（Shaking）によるプリオン増幅の可能性を検討し、PMCA 法の代替手法としての実用性について評価を行った。

Ｂ．研究方法

１）PMCA 産物の生化学的性状解析

L-BSE を経口接種したカニクイザルから採取した各組織検体から PMCA 法により増幅したプロテアーゼ K(PK)抵抗性 PrP (PrPres)について、ウエスタンブロッティングのバンドパターンを解析した。さらに、それぞれの PrPres の PK に対する抵抗性の強度を比較することで、蓄積プリオンの性状の違いを評価した。

２）Shaking 法による PrP から PrPres への構造変換の検討

Shaking 法による構造変換誘導実験には、2 種類の反応液を用いた。1 つ目は、通常の PMCA 法と同様に、野生型マウス脳乳剤を基質とする反応液である。2 つ目は、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系により調製したマウス PrP（Bac-PrP）を基質とし、こちらも PMCA と同様の組成で反応液を調製した。

シードとしてマウス順化プリオン株 6 株および自発生成組換えプリオン株 2 株を用い、それぞれの反応系を 96 ウェルプレートに分注した後、37℃、1,200 rpm にて 2 日間の旋回振盪を行った。これにより、PrP から PrPres への構造変換が誘導可能かどうかを検討した。

（倫理面への配慮）

L-BSE 感染カニクイザル検体は、独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類研究センターより、共同研究の一環として提供を受けたものである。カニクイザルを用いた実験は、同センターにおける動物飼養管理規則および霊長類学会の「霊長類を

用いた動物実験の指針」に基づき実施された。また、L-BSE 感染実験については、独立行政法人医薬基盤研究所の動物福祉・動物管理・使用委員会および動物倫理・バイオセーフティ 委員会の承認を得た上で、倫理的配慮のもと適切に実施された。

C．研究結果

１）L-BSE 経口接種サル各組織由来 PrPres の生化学的性状

L-BSE 経口接種サルの回腸、腸間膜リンパ節、扁桃、脾臓、鼠径リンパ節、頸髄、胸髄、正中神経 、顎下腺、胸腺から増幅した PMCA 産物について、ウエスタンブロッティング(WB)を用いてバンドパターンを解析した。その結果、これらの組織から増幅された PrPres は、複数の異なるバンドパターンを示し、L-BSE 脳内接種サル(#23)の脳由来 PrPres とは明確に異なるプロファイルを有していた（図１A)。特に、L-BSE 経口接種サルの回腸から増幅した低分子の PrPres(◯)はウシ C-BSE 由来 PrPres(●)と非常に類似したバンドパターンを示し（図１B)、さらに PK 抵抗性の性状においても一致していた（図１C)。一方、L-BSE 脳内接種サル脳由来 PrPres の WB バンドパターンおよび PK 抵抗性プロファイルは接種源として使用した L-BSE 感染ウシ脳由来 PrPres と高い相同性を示した。次に、各組織から増幅された C-BSE 様 PrPres (図２A)の PK 抵抗性を比較したところ(図２B)、胸髄、正中神経、および胸腺由来の PrPres は、他の C-BSE 様 PrPres と比較して明らかに PK 感受性が高いことがわかった。これにより、これらの組織に存在したプリオンは C-BSE 様プリオンとは異なる性状を有している可能性が示唆された。

２）Shaking 法によるシード依存的な PrPres の増幅

野生型マウス脳乳剤を基質とした PMCA では、8 プリオン株すべてで PrPres の増幅が認められたが、shaking では 5 プリオン株においてのみ PrPres の増幅が認められた（図３A)。また、増幅したプリオン株についても shaking の PrPres の増幅効率は PMCA より低かった。一方、Bac-PrP を基質とした shaking では、PMCA と同様に Chandler 株以外のすべてのプリオン株において PrPres の増幅が確認され、PMCA と同等の増幅性能を有することが示された（図３B)。

D．考察

１）経口感染により導入された L-BSE プリオンの性状変化

L-BSE プリオンが経口ルートを介してカニクイザルの回腸から体内に取り込まれた後、腸間膜リンパ節やその他のリンパ組織へ移行し、そこでの複製過程において L-BSE プリオンとは異なる生化学的性状を持つプリオンへと変化した可能性が示唆される。L-BSE を脳内接種したサルのリンパ組織では、これまでに WB や免疫組織化学的手法によってプリオンが検出されておらず、L-BSE プリオン自体はリンパ組織内での複製が困難であると考えられてきた。一方で、C-BSE を経口接種したサルでは、扁桃、脾臓、扁桃、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節等のリンパ組織においてプリオンが検出されている。これらの結果を踏まえると、経口的に導入された L-BSE プリオンは、腸管を経由して体内に侵入した後、その構造的・生化学的性状を C-BSE 様に変化させることで、リンパ組織内での複製能を獲得した可能性が高いと考えられる。

２）Shaking 法による構造変換の実現とその意義

本研究により、超音波処理を使用せず、Shaking による物理的エネルギー入力のみで、PrP から PrPres への構造変換が可能であることが明らかとなった。この結果は、PrPres の増幅過程において、シードとなるプリオン多量体の増加に不可欠と考えられていた、プリオン凝集体の断片化を目的とした超音波処理は必須ではなく、振盪による力学的刺激のみで構造転換が進行できることを示している。さらに、Shaking 法は装置コストや処理可能な検体数の点で優れており、将来的に PMCA 法の代替手法としての可能性を有する。

E．結論

１）カニクイザルにおいて、経口的に接種された L-BSE プリオンは体内で性状を変化させ、C-BSE 様のプリオンへと変異することで、リンパ組織内での感染・複製が成立した可能性が示唆された。これは、L-BSE プリオンの異常プリオン構造が、感染経路に応じて変化することを示す重要な知見である。

２）Bac-PrP を基質とした Shaking 法は、PMCA 法と同様のプリオン増幅が可能であることが示された。これにより、今後のプリオン研究において、より簡便かつ経済的な試験管内増幅系の開発が進展する可能性が期待される。

Ｆ．健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

１．論文発表

Imamura, M., Hagiwara, K., Tobiume, M., Ohno, M., Iguchi, H., Takatsuki, H., Mori, T., Atarashi, R., Shibata, H., Ono, F. (2025) Administration of L-type Bovine Spongiform Encephalopathy to Macaques to Evaluate Zoonotic Potential. *Emerging Infectious diseases,* 31(5), 986-990

2.学会発表

Asian Pacific Prion Symposium 2024, 2024 年 11 月 30 日, 12 月 1 日, 北海道大学、ポスター発表（Oral Transmission of L-type Bovine Spongiform Encephalopathy in Cynomolgus Macaques: Detection of Classical BSE-like Prions in Lymphoid Tissues）

H. 知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

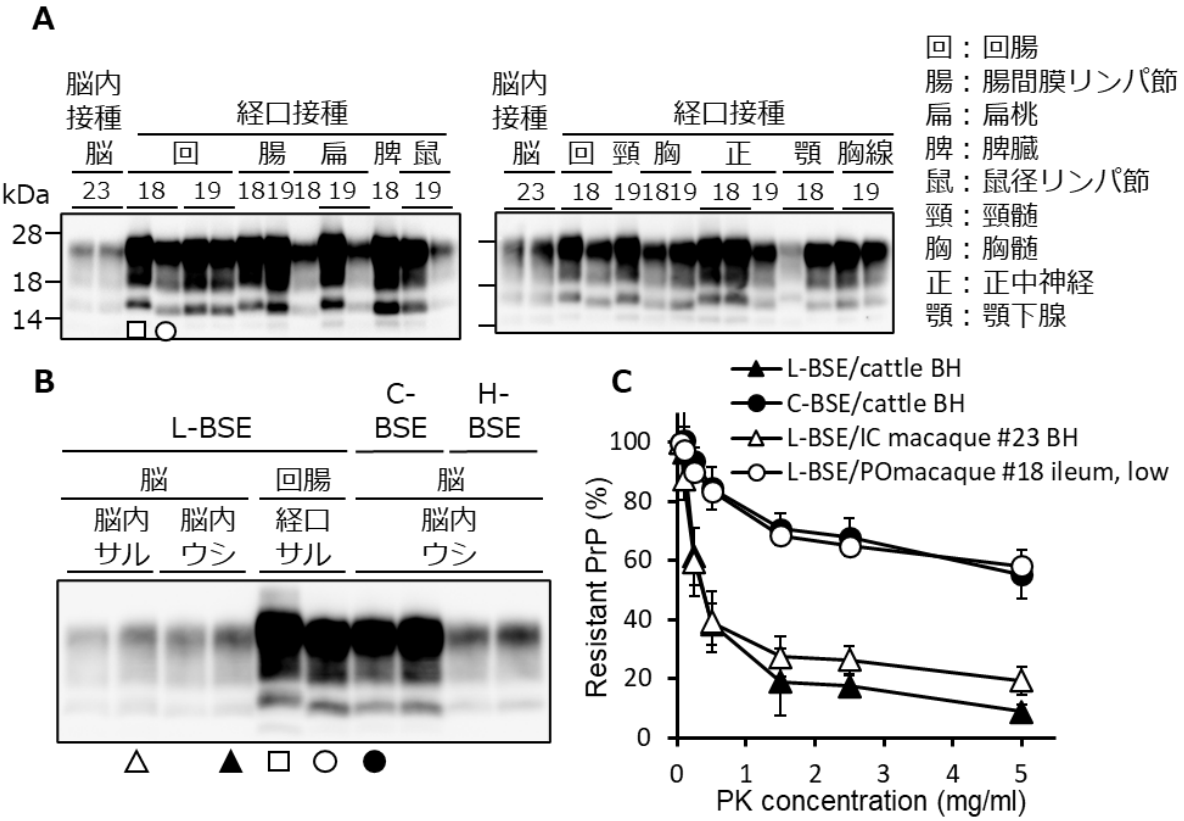


図1. L-BSE経口接種サル各組織由来PrPresの生化学的性状(A)L-BSE経口接種サルの各組織（回腸、腸間膜リンパ節、扁桃、脾臓、鼠径リンパ節、頸髄、胸髄、正中神経 、顎下腺、胸腺）からPMCAにより増幅されたプロテアーゼK(PK)抵抗性PrP (PrPres)について、ウエスタンブロッティングによるバンドパターンをL-BSE脳内接種サル脳由来PrPresのバンドパターンと比較した。(B) L-BSE経口接種サル回腸由来PrPresと、各種BSE感染ウシおよびサル脳由来PrPresとの間で、バンドパターンを比較した。 (C) L-BSE経口接種サル回腸由来PrPres、L-BSEおよびC-BSE感染ウシ脳由来PrPres、L-BSE脳内接種サル脳由来PrPresのPKに対する抵抗性の強度を比較した。

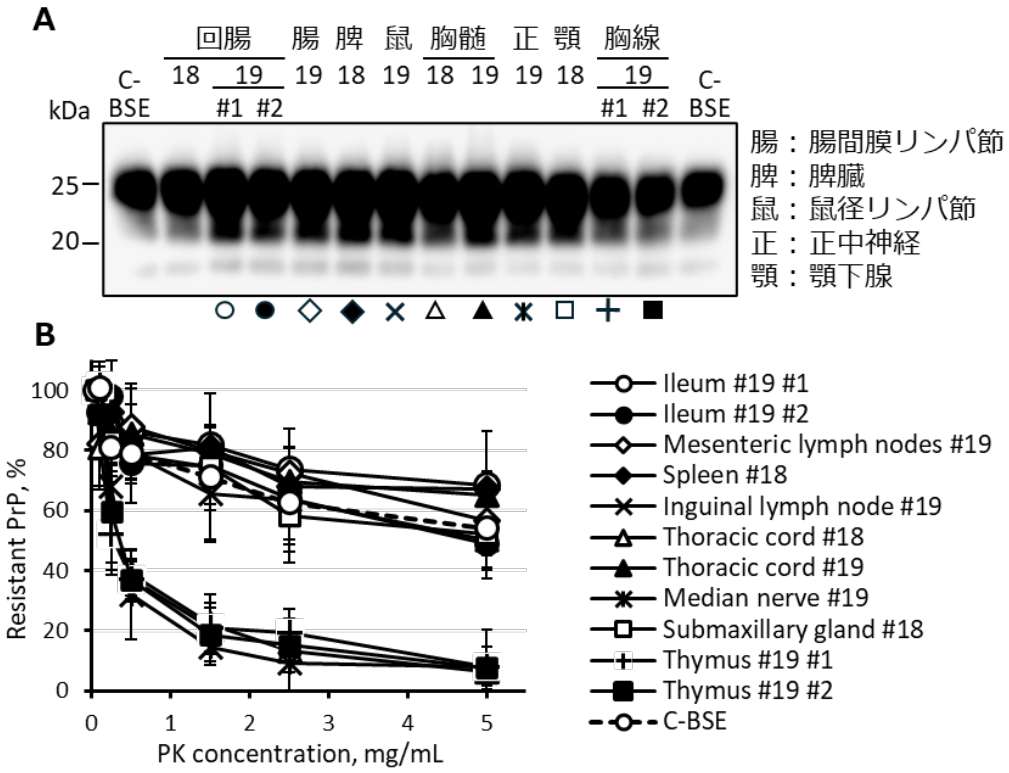


図2. L-BSE経口接種サル各組織からのC-BSE様PrPresの生化学的性状 (A) L-BSE経口接種サルの各組織（回腸、腸間膜リンパ節、脾臓、鼠径リンパ節、正中神経 、顎下腺、胸腺）からPMCAにより増幅されたC-BSE様PrPresのバンドパターンを、ウエスタンブロッティングにより比較した。(B) 各組織由来C-BSE様PrPresのPKに対する抵抗性の強度を比較した。

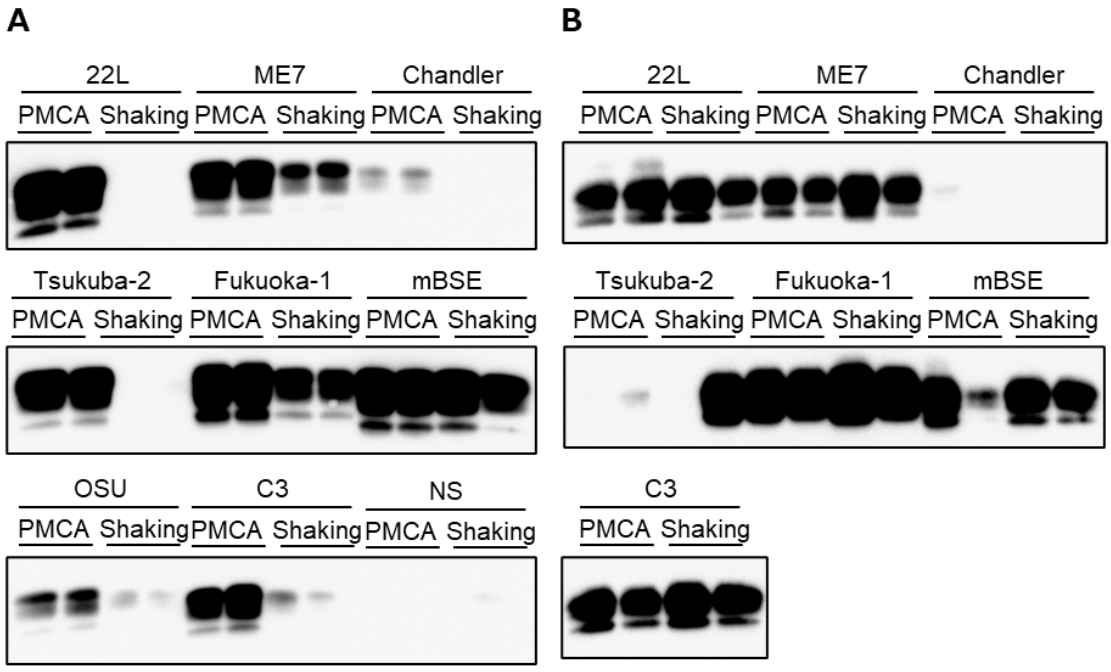


図3. Shaking法によるPrPresの増幅 野生型マウス脳乳剤(A)およびバキュロウイルス-昆虫細胞由来組換えPrP (B)を基質として、それぞれPMCAおよびShakingを用いてPrPres増幅を試みた。反応後、プロテアーゼK処理し、ウエスタンブロッティングによりPrPresの検出を行った。シードとしてマウス順化株6株および自発生成組換えプリオン株 (OSU, C3)を使用した。

4. H-、L-BSE プリオンを投与したカニクイザルの異常型プリオン蛋白質の検索およびプリオンが持続感染可能な培養細胞の開発

分担研究者　萩原　健一（国立感染症研究所 細胞化学部　主任研究官）
研究協力者　小野　文子（岡山理科大 獣医学部）
柴田　宏昭（予防衛生協会）
飛梅　実（元・国立感染症研究所 感染病理部、現・国立研究開発法人 日本医療研究開発機構）

研究要旨

ウシ H-BSE プリオンを脳内接種（＃024、025）または経口投与（#026、027）したカニクイザルの神経組織およびリンパ組織おける異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の蓄積の有無について、ウエスタンブロット法（WB 法）による検索を令和4年度から5年度末まで進めてきた。本年度（令和6年度）はデータを補充し、これまでの結果を論文として上梓した。また、カニクイザルへ初代伝播後の L-BSE プリオンをさらにカニクイザル（個体番号＃034、035）へ脳内接種（2代目伝播）し、発症前の潜伏期間中に安楽死に処した。脳・脊髄の PrP^{Sc} の蓄積の有無について WB 法による予備的検索を昨年度に行ったが、本年度は、昨年度の分析の追試を行い、データの再現を確認した。これまでの結果から、潜伏期間のプリオンが接種部位から拡散する中途段階の洞察が得られた。一方、ヒト由来の神経芽細胞腫由来の一細胞にカニクイザル PrP を発現させると、サル馴化 C-BSE プリオンが持続感染できることを先に見出した。ただし、この細胞は内在性ヒト・プリオン蛋白質（PrP^{C}）を発現しており、ヒト PrP^{C} とカニクイザル PrP^{C} との相互干渉が懸念された。そこで、ヒト *PRNP* を欠失させたノックアウト細胞をゲノム編集により作出した。ノックアウト細胞に新たにカニクイザル *Prnp* を導入し、C-BSE プリオン感染ザルの脳ホモジネートと共に培養すればサル馴化 C-BSE プリオンが持続感染するだろうと期待した。しかし実験を行ったところ、細胞をサル馴化 C-BSE プリオンへ暴露後、細胞の継代を重ねると細胞の PrP^{Sc} 量が徐々に減少し、期待に反して持続感染が成立しなかった。培地、脳ホモジネートの前処理、脳ホモジネートの細胞への添加方法などの条件を種々試みているが、持続感染細胞の樹立に至っていない。

A. 研究目的

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

また、動物を使う *in vivo* 感染実験はプリオン研究において重要であるが、動物実験の代替／削減の観点から、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系の開発も望まれる。マウス神経芽細胞腫に由来する N2a 細胞は、マウスへ馴化したスクレイピー・プリオンが持続感染できる有用な細胞である。（Butler ら、J Virol, 62: 1558 (1988)）。しかし、N2a 細胞に持続感染できるプリオン株の種類は限られることがこれまでに知られている。BSE プリオンあるいは他の動物のプリオンのヒトへの伝播リスクなどを検討するうえで、また、本研究班が取り組んできたC-およびL-BSEプリオンのカニクイザルを用いた *in vivo* 研究を *in vitro* 研究へ発展させるためにも、プリオンが持続感染できるヒト由来細胞ないし霊長類由来細胞が求められている。ウシ BSE プリオンやカニクイザル馴化 BSE プリオンが持続感染する培養細胞が樹立されると、BSE プリオンについての研究、例えばヒト *Prnp* のさまざまな遺伝子多型と BSE プリオンの感染リスクの高低を *in vitro* 系で検証可能となる。そこで本研究では、プリオンが持続感染・増殖できる新たな細胞株を得ることを目的とし、最初の目標として‘サル馴化 BSE プリオンが持続感染・増殖できる細胞株の開発’を据えた。

B. 研究方法

1）H-BSE プリオンのカニクイザルへの初代伝播実験の生化学分析

H-BSE 罹患ウシの脳乳剤をカニクイザルへ脳内接種ないし経口投与した（接種／投与、経過観察および安楽死・採材は、小野、柴田による）。以下の経過期間を経た個体を安楽死に処し、昨年度に引き続き、各採材部位の異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の蓄積を WB 法により調べた。

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

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

2）L-BSE プリオンのカニクイザルへの2代目伝播実験の生化学分析

カニクイザル馴化 L-BSE プリオン（ウシからサルへの脳内接種による初代伝播プリオン）をカニクイザル2個体（#034、035）へ脳内接種（2代目伝播）し、潜伏期間中（接種後 13 ヶ月目）に安楽死に処した。昨年度は、#034 について WB 法により脳・脊髄の PrP^{Sc} の蓄積を予備的に調べた。本年度は昨年度の WB 分析の追試を行い、データの再現性・信頼性を確認した。#035 については、現在、分析を進めている。

3）プリオンが持続感染する培養細胞株の開発

株化細胞５種（RK13, LLC-RK1, PG-4, IMR32, CAD)について、初期のスクリーニングから IMR32 細胞が有用と考えられた。そこで、IMR32 細胞の内在性ヒト *PRNP* を CRISPR/Cas9 法により欠失させ、*PRNP* ノックアウト細胞を作出し、クローニングした。このノックアウト細胞のゲノム DNA にカニイクイザル *Prnp* を組み込み（EF1αプロモータもしくは CMV プロモータを使用）、サル PrP^{C} を恒常的に発現する細胞集団を取得した。細胞密度が約 60%の段階で培地に C-BSE プリオンあるいは L-BSE プリオン感染カニクイザルの脳ホモジネートを添加し、細胞密度が 90%程度に至る時点でプリオンを含まない培地へ継代した。細胞を数回継代後、細胞を溶解し、PrP^{Sc} を WB 法により検出した。なお、サル脳ホモジネートの添加方法として、①細胞懸濁液と脳ホモジネートを混合・インキュベート後、培養プレートに播種する（この際に、通常の単層培養用プレートを用いる、メチルセルロースに包埋する、スフェロイド形成向きのプレートを用いる、ことを試みる）、②単層培養した細胞へ脳ホモジネートを上掛けする、③培地に E-MEM, D-MEM, Opti-MEM, Neurobasal を用いる、等を試みた。

（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）H-BSE プリオン投与ザルの神経組織およびリンパ組織について、昨年度までに実施した分析を補強するデータを得て、一連の実験を完了した。

2）L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルの発症前の神経組織の PrP^{Sc} について、本年度は、昨年度の予備的な WB 分析の追試を行い、データの再現を確認した。これまでの分析データから、接種部位からプリオンが拡散・増殖する途上の洞察が得られた（以下の D 欄を参照）。実験データを小野博士（研究協力者）と共有した。

3）IMR32 細胞の内在性 *PRNP*（ヒト・プリオン蛋白質遺伝子）を欠失させたノックアウト細胞を数クローン得た。*PRNP* の DNA 塩基配列を解読し、狙った部位でゲノム編集が起きていることを確認した。さらにノックアウト細胞にカニクイザル *Prnp* を導入した改変細胞では、細胞膜に PrP が局在すること、PrP の発現量が IMR32（親細胞）と同等もしくは若干多いことを、PrP 抗体を用いた細胞の免疫染色および細胞溶解物の WB 分析により確認した。改変細胞を C-BSE プリオン

またはL-BSEプリオンを感染させたカニクイザルの脳ホモジネートへ暴露し、プリオンの持続感染が起こることを期待したが、期待に反して持続感染は成功していない。

D. 考察

1)ウシ H-BSE プリオンのヒトへの感染リスクは、昨年度の研究報告書において考察したとおり、C-BSE プリオンよりも実質的に低いと推測された。

2)L-BSE プリオンを頭頂左側から脳内接種したカニクイザルについて、接種後約1年後に接種部位からプリオンが拡散・増殖する途上の洞察が得られた。個体(#034)は、明らかな神経症状を呈していない潜伏期間に安楽死・採材したものであるが、既にこの段階でプリオンは前頭葉の左右両半球で顕著に増殖していた。側頭葉、後頭葉では接種側における増殖・分布が優位だった。脳幹・延髄では、接種の反側での増殖に優位性が認められ、これは錐体交差によるためであると考えられた。先の研究で扱った終末期採材サル(#022、023)では脊髄頸部、胸部、腰部に一様に PrP^{Sc} が検出されたが、#034 では頸部＞胸部＞腰部の順に PrP^{Sc} 量が減少し、発症前ながら脊髄遠位へ PrP^{Sc} が徐々に下降していることが示された。

3)親細胞では持続感染が見られたのに対して、*PRNP* を欠失させてサル *Prnp* を代わりに導入した細胞では持続感染が維持できず、当初の構想に達していない。ノックアウト細胞の樹立の際に細胞のクローニングが必須であり、クローニングにより選択した細胞の適性が関わっている可能性がある。因みに、本研究と同様の発想で、マウス神経芽細胞腫由来のCAD5 細胞を基にしてハムスター馴化スクレイピープリオンやCWDプリオンが持続感染できる改変細胞が作られている[J. Biol. Chem., 294, 4911 (2019); Sci Rep 9, 11151 (2019)]。私も細胞バンクからCAD細胞を入手して検討したが、入手したCAD細胞の顕微鏡での形態が培養下であまり安定ではない(培養の加減で培養フラスコへの接着性が変化する、など)。

E. 結論

以下の結論を得た。

- ウシ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いと総合的に判断し、ウシ H-BSE プリオンのヒトへの感染リスクは、C-BSE プリオンよりも実質的に低いと推測・結論した。研究データを論文として整理して投稿し、上梓した(論文発表の1))。
  ただし、この推測・結論が少数個体のカニクイザルを使った実験から得られたものであるという点は、今後も留意すべき点である。

- カニクイザル PrP を発現する改変細胞を作り、サル馴化C-BSEプリオンおよびL-BSEプリオンの持続感染を試みた。昨年度に引き続き、プリオンへの暴露を種々の異なる方法で試みているが、持続感染が成立した細胞群は得られていない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibata, H., Ono, F., Sato, Y., Ohto, K., Nakano, N., Imamura, M., Horiuchi, M., Tobiume, M. and Hagiwara, K. Lack of evidence for transmission of atypical H-type bovine spongiform encephalopathy prions (H-BSE prions) by intracranial and oral challenges to nonhuman primates. Microbiol. Immunol., 69: 25-34, 2025

2) Imamura, M., Hagiwara, K., Tobiume, M., Ohno, M., Iguchi, H., Takatsuki, H., Mori, T., Atarashi, R., Shibata, H. and Ono, F. Administration of L-type bovine spongiform encephalopathy to macaques to evaluate zoonotic potential. Emerg. Infect. Dis., *in press*.

2. 学会発表

1) Shibata, H., Ono, F., Sato, Y., Ohto, K., Nakano, N., Imamura, M., Horiuchi, M., Tobiume, M. and Hagiwara, K. Lack of evidence for transmission of atypical H-type bovine spongiform encephalopathy prions (H-BSE prions) by intracranial and oral challenges to nonhuman primates. Asian Pacific Prion Symposium 2024 (November, 30 - December, 1, 2024, Sapporo)

2) Imamura, M., Hagiwara, K., Tobiume, M., Ohno, M., Iguchi, H., Takatsuki, H., Mori, T., Atarashi, R., Shibata, H. and Ono, F. Oral transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy in cynomolgus macaques: Detection of classical BSE-like prions in lymphoid tissues and peripheral nerves. Asian Pacific Prion Symposium 2024 (November, 30 - December, 1, 2024, Sapporo)
3) Hagiwara, K and Imamura, M. Progress in transmission studies on atypical L- and H-BSE prions with non-human primates, cynomolgus monkeys. Asian Pacific Prion Symposium 2024 (November, 30 - December, 1, 2024, Sapporo)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

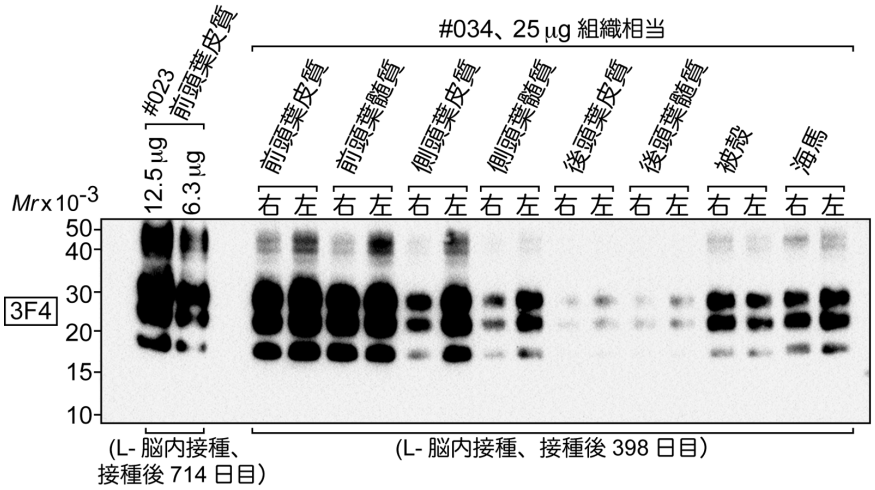


図1　#034 の脳の PrP^{Sc} の検出（3F4 抗体による）

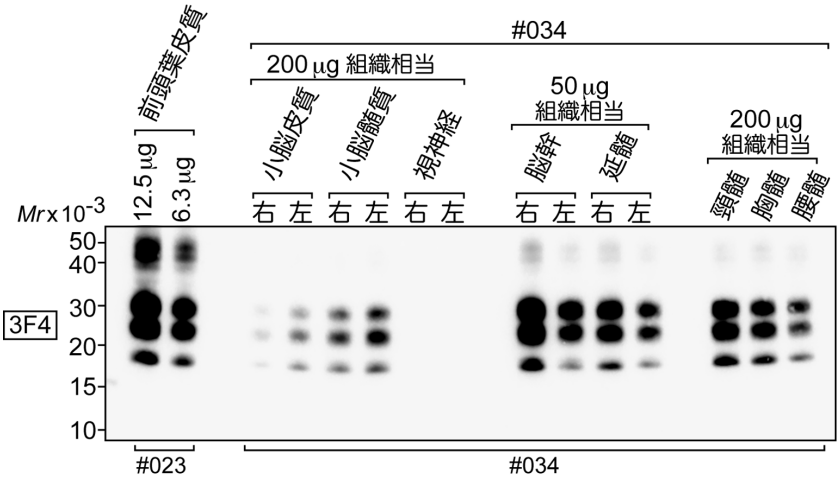
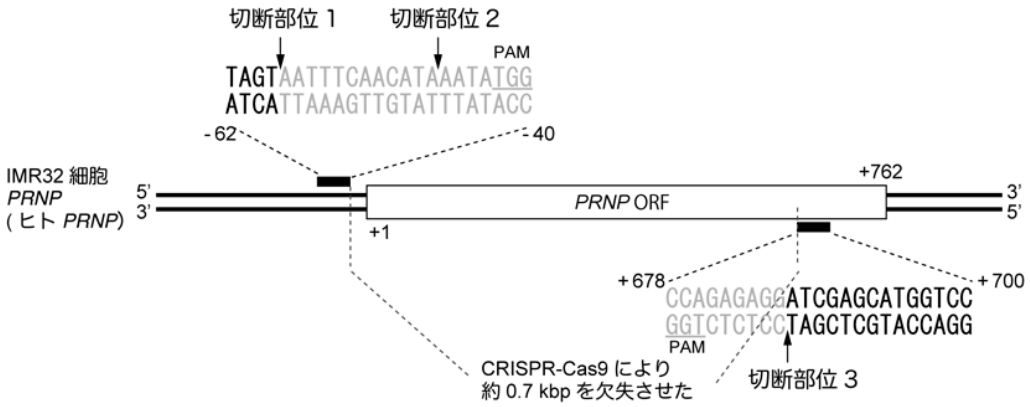


図2　#034 の小脳、視神経、脳幹部、延髄、脊髄の PrP^{Sc} の検出（3F4 抗体による）



DNA 配列分析の結果、IMR32 細胞の *PRNP* 遺伝子座は２倍体だった。CRISPR-Cas9 により、片方のアレルで’切断部位 1 と切断部位 3 の間’の欠失が生じ、もう片方のアレルで’切断部位 2 と切断部位 3 の間’の欠失が生じたことを確認した。

図3　内在性 *PRNP* のノックアウトの結果の模式図

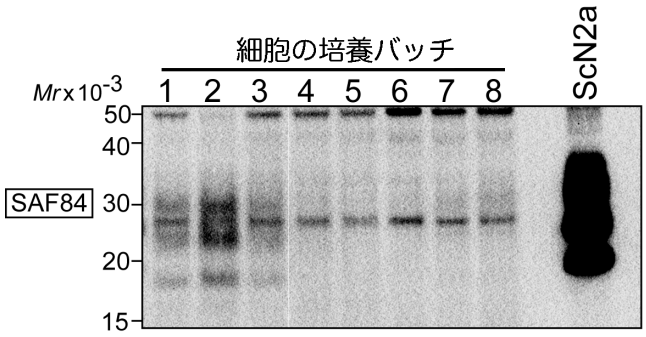


図4　IMR32 細胞の内在性 *PRNP* を欠失させた後、カニクイザルの *Prnp* を導入した。培地に C-BSE プリオン感染カニクイザルの脳ホモジネートを加えて細胞を培養・継代後、細胞溶解液（細胞ライゼート）を proteinase K（PK）消化にかけて PrP^{res} (PrP^{Sc})を SAF84 抗体により検出した。
異なる培養バッチ1から8のうち、バッチ2の PrP^{res} 量が最多であるが、比較対照の ScN2a の PrP^{res} 量よりも格段に少ない。継代を更に重ねると、PrP^{res} 量は徐々に減少した。バッチ8とほぼ同じ回数を継代したバッチ4、5、6、7、8では、PrP^{res} に相当する陽性バンドが検出できなかった。（ウエスタンブロット分析にかけた細胞溶解液の量：バッチ1から8；PK 消化前の蛋白質総量として 360 µg、ScN2a; PK 消化前の蛋白質総量として 90 µg）

5. 非定型 BSE カニクイザル感染モデルを用いたプリオン病の病態解明

分担研究者　小野　文子　（岡山理科大学　獣医学部　）
研究協力者　柴田　宏昭　中野　望　（社団法人予防衛生協会）
飛梅　実、佐藤　由子、萩原　健一（国立感染症研究所）

研究要旨

非定型 BSE（L-BSE）に対するヒトへの感染リスク評価の一環として、カニクイザルを用いた霊長類モデルにおける病態の進行過程を解析した。過去に実施した C-BSE、H-BSE 感染実験を含む各種サンプルの整備を行い、研究資源として活用可能なバイオバンクの構築を進めた。また、L-BSE 発症サル脳乳剤を用いて脳内接種を行った 4 頭のカニクイザルにおいて、発症前群（398 日・399 日）および発症後群（684 日・714 日）の時点で解剖を実施し、病理学画像解析を行った。発症前群では臨床症状は認められなかったが、異常プリオン（PrP^{Sc}）の沈着、リン酸化タウの増加、グリア細胞の増生がすでに確認されており、病態進行の初期変化が示唆された。一方、発症後群では、神経症状の進行とともに脳室拡張・萎縮が MRI で認められ、組織学的にも顕著な空胞変性、タウの異常蓄積、GFAP 陽性細胞の増加が認められた。以上の結果は、L-BSE の発症初期段階における脳内変化の動態を明らかにするとともに、発症機序の理解に資する知見を提供するものである。

A. 研究目的

食用動物に由来するプリオンがヒトに及ぼすリスクを評価する上で、ヒトに近縁な霊長類を用いた感染実験は、有用な知見をもたらす。われわれは 2003 年に、国内で唯一の霊長類感染実験系を構築し、これまでに定型 BSE（C-BSE）、および非定型 BSE（L-BSE、H-BSE）について、カニクイザルを用いた感染実験を継続してきた。

これまでの実験により得られた生体材料は、食用動物等におけるプリオン病の病態機序解明や、ヒトへの感染リスク評価において、極めて重要な研究資源である。これら貴重なサンプルを有効活用するため、共有可能な研究材料としてバイオバンクの構築を進めることとした。

本研究では、カニクイザルを用いたプリオン病発症モデルを活用し、感染初期および発症後における特徴的なバイオマーカーや病理組織学的変化を比較検討することにより、プリオン病の発症機序の解明を目的とする。これまでの知見から、C-BSE 感染カニクイザルはヒトの変異型 CJD、L-BSE 感染カニクイザルは孤発性 CJD に類似した病態を呈し、脳内接種により高い病原性を示すことが明らかとなっている。一方、H-BSE は霊長類に対して病原性が極めて低いことが示唆されている。そこで、霊長類に病原性の高い L-BSE 株を接種したカニクイザルを対象に、発症前および発症後の脳組織を用いた詳細な画像解析を行い、神経細胞変性に至る発症メカニズムの解明を目指す。

B. 研究方法

1）バイオバンクの構築

2003 年から 2023 年にかけて実施したカニクイザルを用いた BSE プリオン感染実験により得られた生体材料について、収集リストを作成し、研究資源として保存・活用できるようバイオバンクの構築を進めた。

2）L-BSE 接種カニクイザルの感染ステージにおける病態解析

（1）供試動物

独立行政法人医薬基盤・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）にて出生・育成された、投与時年齢 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

において馴化飼育を行い、その後、感染実験を開始した。飼育環境は、室温 23～27℃、相対湿度 50～60%、照明 12 時間(7:00～19:00)に設定し、アイソレーターの前面および側面には窓を設け、隣の個体とのアイコンタクトが可能な社会的環境を整えた。

給餌は、固形飼料(Type AS; Oriental Yeast Co., Ltd.)70g およびリンゴ 100g を 1 日 1 回行った。

(2)実験群および接種材料

L-BSE 脳内接種群:BSE(BSE JP/24、佐世保:L-BSE)をカニクイザルに脳内接種し発症させた個体から調製した 10%脳乳剤を、カニクイザル 4 頭に接種した。

(3)接種方法

L-BSE 脳内接種群:BSE(BSE JP/24、佐世保:L-BSE)をカニクイザルに脳内接種し発症させた個体から調製した 10%脳乳剤を、カニクイザル 4 頭に接種した。

(4)検体採取

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

(5)行動観察(神経・精神症状評価)

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

プリオン病主要観察項目

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

②精神症状:抑鬱状態、自傷行為、食欲不振、あくび、驚愕反応、不穏

(6)MRI 撮像

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。

(7)安楽死・解剖

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)の混合麻酔下でサンプリングを実施、ヘパリンナトリウムを 1 万単位静脈内投与後、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。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。

(8)病理組織像の解析

10%緩衝ホルマリンまたは 4%PFA で固定後、脳を 5mm 厚に切り出したのち再固定後 98%ギ酸で室温 1 時間処理し、感染性プリオンの失活を行った後薄切しHE染色を行った。免疫染色は抗体 3F4(Bio Legend 社製 :Catalog#800303)、抗ヒト PHF-Tau モノクローナル抗体 AT270(Thermo 社製:Catalog # MN1050)、GFAP 抗体を用いて染色した。染色した病理組織標本をバーチャルスライドスキャナ(NanoZoomer、浜松ホトニクス)で取り込み、側頭葉皮質および髄質について Definiens XD ソフトウェア(Definiens社)を用いて画像解析を行った。

(倫理面への配慮)

BSE 接種動物はすべて P3 アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とした。ケージ内にはステンレスの鏡やチェーンを入れると共に、定期的に行うアップルテストや食物回収試験により、ヒトとの触れ合いが福祉向上に有効と考え、ケージ内サルのストレスの軽減に努めた。材料採取及び脳波測定は麻酔下において実施した。

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

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本指針」を遵守し、医薬基盤・健康・栄養研究所及び岡山理科大学動物動物実験委員会の承認を得ておこなった。病原体の取扱については、医薬基盤・健康・栄養研究所バイオセーフティー委員会の承認を得ておこなった。

C. 研究結果

1）バイオバンクの構築

感染材料は C-BSE（和歌山株）、L－BSE（BSE JP/24）、H-BSE（イタリア株）の牛脳乳剤および、接種カニクイザル継代脳乳剤である。接種ルートは脳内接種、経口接種、静脈内接種、腹腔内接種を 32 頭に実施し、そのうち、21 頭分の経時的生体サンプルおよび解剖時の臓器について 2mlマイクロチューブに保存した。経時的生体サンプルとしては脳脊髄液、血漿、白血球、唾液、尿である。臓器検体のうち、発症が認められた脳および脊髄サンプルについてはP2 検体として保存した。検体数は経時的生体サンプル 1433 検体、解剖時臓器サンプル 1049 検体　計 2482 検体である。（Table 1）

2）L-BSE 接種カニクイザルの感染ステージにおける病態解析

発症前群（Pre Onset）の 2 頭（＃34，＃35）は接種後 398 日目および 399 日目に安楽死解剖を行った。解剖時まで明らかな神経症状は認められなかった。発症群（Post Onset）の 2 頭（＃22，＃23）は接種後 684 日目、714 日目に安楽死解剖を行った。＃22 に明らかな神経症状が観察されたのは接種後 485 日目で解剖までの発症期間は 199 日であった。神経症状として、振戦、麻痺、ミオクローヌス、起立不能、反応性低下、認知脳低下が認められた。#23 に明らかな神経症状が観察されたのは、接種後 406 日目で解剖までの発症期間は 308 日であった。神経症状は、深浅、軽度麻痺、ミオクローヌス、認知脳低下であった（Table 2）。

安楽死直後の MRI 所見では発症前群（#34、#35）では軽度の脳室の拡張の所見が認められた。発症群（#22、＃23）では脳室の拡張と脳の萎縮が認められ特に、＃23 では顕著であった。

病理組織所見では HE 染色において、発症前群の大脳皮質に空胞変性は散在していた。空胞変性は大脳髄質ではいずれの個体でも観察され、発症前群#34 の接種反対側および発症後群#23 で軽度であった。大脳皮質では発症前群の 2 頭では接種反対側に比べて接種側で多く検出された。発症後群の 2 頭ではいずれも顕著な空胞変性が認められた。リン酸化タウは、発症前群の接種側髄質で顕著であった。異常プリオンの沈着は＃34 の大脳皮質で顕著に認められ、特に接種側で多数検出された。GFAP 染色によるグリアの増生は発症後群＃22 では実施していない。発症前群＃34 のでは大脳皮質、髄質とも顕著な増生が認められたが、＃35 では軽度であった。発症後群の＃24 では大脳皮質および髄質も増生が認められ特に大脳髄質で顕著であった（Table 3）。

D. 考察

本研究では、過去 20 年にわたり実施されてきたカニクイザルへの BSE 感染実験から得られた多数の生体試料および臓器サンプルを体系的に収集・整理し、研究資源として再活用可能なバイオバンクの構築を進めた。接種株、接種ルート、臨床経過、発症日数、解剖時所見などの臨床情報とサンプルを対応させることで、非常に高い精度の「実験履歴付き試料アーカイブ」が実現している点は、他に例を見ない特徴である。バイオバンクに保存されたサンプルは、定型 BSE（C-BSE）だけでなく、非定型 BSE（L-BSE、H-BSE）にも対応しており、脳脊髄液、血液成分、唾液、尿といった生体材料から、脳・脊髄・末梢神経・全身臓器に至るまで、多様な組織が網羅的に収集されている。これにより、

病態進行における時間的変化や臓器別のプリオン分布解析、さらには非侵襲的検体を用いた診断バイオマーカー探索への応用が期待される。今後、このバイオバンクを国内外の研究機関と連携して活用することで、プリオン病の発症メカニズム、感染リスク評価、診断法の開発など、幅広い研究分野への波及が見込まれる。特にヒトと近縁な霊長類モデルから得られたサンプルであることから、実験動物倫理の観点でも貴重なデータ活用を実現する仕組みとして、本バイオバンクの整備と持続的運用の意義は極めて大きいと考えられる。

非定型 BSE の L-BSE に対して、ヒトに近縁なカニクイザルを用いた感染モデルを構築し、発症前後の時系列で病態進行の解析を行った。特に、PrP^{Sc} の沈着、リン酸化タウの蓄積、GFAP 陽性グリアの増生といったマーカーの時間的変化を比較したことで、発症前段階から既に中枢神経系における異常変化が進行していることが明らかとなった。発症後群においては、臨床症状の顕著な個体(#23)において、MRI 画像上で脳室の拡張および萎縮が最も顕著に認められたことから、神経変性の進行に伴う構造的脳変化が示唆された。一連の組織学的解析からは、以下のような病態進行モデルが想定される:

1. 接種部位(被殻)からの異常プリオンの拡散:
→ 髄質へ軸索性に拡散
2. リン酸化タウの早期上昇:
→ 小胞輸送障害を誘発し、神経細胞内の PrPSc 蓄積
3. グリア細胞の活性化(GFAP 上昇):
→ 炎症性反応・代謝環境変化を引き起こす
4. タウ毒性および小胞輸送破綻:
→ 空胞変性を介して神経細胞死へと進行

髄質は比較的 PrPSc の沈着に耐性を示すが、グリア細胞を介した慢性的な障害によって、やがて皮質へと進行することが推察される。また、発症後の症状進行速度と病理像には個体差が認められたことから、今後、より詳細な他脳部位の統計学的解析により病態機序が明確になると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibata, H., Ono, F., Sato, Y., Ohto, K., Nakano, N., Imamura, M., Horiuchi, M., Tobiume, M. and Hagiwara, K. Lack of evidence for transmission of atypical H-type bovine spongiform encephalopathy prions (H-BSE prions) by intracranial and oral challenges to nonhuman primates. Microbiol. Immunol., 69: 25-34, 2025
2) Imamura, M., Hagiwara, K., Tobiume, M., Ohno, M., Iguchi, H., Takatsuki, H., Mori, T., Atarashi, R., Shibata, H. and Ono, F. Administration of L-type bovine spongiform encephalopathy to macaques to evaluate zoonotic potential. Emerg. Infect. Dis., 986-990.

2. 学会発表

1) Shibata, H., Ono, F., Sato, Y., Ohto, K., Nakano, N., Imamura, M., Horiuchi, M., Tobiume, M. and Hagiwara, K. Lack of evidence for transmission of atypical H-type bovine spongiform encephalopathy prions (H-BSE prions) by intracranial and oral challenges to nonhuman primates. Asian Pacific Prion Symposium 2024 (November, 30 - December, 1, 2024, Sapporo)
2) Imamura, M., Hagiwara, K., Tobiume, M., Ohno, M., Iguchi, H., Takatsuki, H., Mori, T., Atarashi, R., Shibata, H. and Ono, F. Oral transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy in cynomolgus macaques: Detection of classical BSE-like prions in lymphoid tissues and peripheral nerves. Asian Pacific Prion Symposium 2024 (November, 30 - December, 1, 2024, Sapporo)

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

Table 1 バイオバンクリスト(○:バンク導入検体)

夰軎喙 哐ă 伓ă	徒↲ 軯 寅13.	㎫坌五浤	τƒ Π	扈哥	⇨ 庫哥⊇	咥㊦丞箋	㎫坌箋	㎫坌㊦根	嗚唱箋	徒↲ 箋	㎫坌テ㊦瞰	劈x 乩揮	嗚唱乩揮
		B,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	梻/0	021/0/6/67	1//0.6.0	1//2.3.02	0-7	匙	1//2.0/.2/	/-4		
		B,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	梻/1	011/0/7/42	1//0.7.0	1//2.3.02	0-6	匙	1//2.0/.2/	/-4		
		B,ARD厈宅ў ⮓	定実	梻/2	021/0/8/83	1//0.8.0	1//2.3.02	0-5	匙	1//2.0/.2/	/-4		
		B,ARD厈宅ў ⮓	定実	梻/3	021/0/3/27	1//0.3.0	1//2.3.02	1-/	匙	1//2.0/.2/	/-4		
†	†	B,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″/4	011/0/4/17	1//0.4.1	1//2.7.5	1-2	匙	1/05.7.07	02-/		
		B,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″/5	011/0/4/20	1//0.4.10	1//2.7.5	1-1	匙	1/0/.01.11	6-3		
		B,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″/6	011/0/6/36	1//0.6.14	1//2.7.5	1-/	1//4.00.0	1//5.8.5	2-0	1-1	/-7
†	†	B,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″/8	021/0/3/31	1//0.3.18	1//2.8.02	1-3	匙	1/05.8.05	02-/		
		B,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″0/	011/0/4/24	1//0.4.18	1//2.8.02	1-2	1//5.0.0	1//5.7.04	1-8	1-2	/-5
		B,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″00	011/0/4/18	1//0.4.4	1//2.8.02	1-3	1//6.5.0	1//7.6.06	3-7	2-6	0-0
		B,ARD嗚唱0 τ 廖决'″6(	斥孺₇	梻01	021/4/3/40	1//4.0.0	1//5.8.01	0-6					
		B,ARD嗚唱0 τ 廖决'″6(	斥孺₇	梻02	011/4/0//2	1//4.7.0	1//5.8.01	0-0					
†		K,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″03	021/4/7/78	1//4.7.06	1//6.8.01	1-0	1//8.5.0	1//8.0/.12	1-0	0-6	/-3
†		K,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″04	021/4/80/1	1//4.8.03	1//6.8.01	1-/	1//8.3.0	1//8.7.17	1-/	0-5	/-3
		B,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 00'″6(	宅₇	″05	031/4/7/1/	1//4.7.04	1//6.8.01	1-0	1//8.2.0	1//8.4.0	0-5	0-4	/-1
		B,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 00'″6(	宅₇	″06	031/4/8/13	1//4.8.02	1//6.8.01	1-/	1//7.0/.0	1//8.3.03	0-5	0-0	/-4
†	†	K,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″07	0310//5/44	1/0/.5.06	1/00.7.20	0-1	匙	1/06.00.5	5-1		
†	†	K,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″08	0210//4/25	1/0/.4.00	1/00.7.20	0-2	匙	1/06.00.5	5-1		
†	†	B,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 01'″06(	宅₇	″1/	0310//6/56	1/0/.6.08	1/01.2.16	0-6	1/02.4.7	1/02.8.1/	0-4	0-0	/-3
†	†	B,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 01'″06(	宅₇	″10	0310//6/53	1/0/.6.4	1/01.2.16	0-6	1/02.4.7	1/02.8.2/	0-4	0-0	/-3
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 00'″04(	宅₇	″11	0310/0//7/	1/0/.0/.08	1/01.2.17	0-3	1/02.6.15	1/03.2.01	1-/	0-2	/-5
†		K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 00'″04(	宅₇	″12	0310/00/74	1/0/.00.04	1/01.2.17	0-3	1/02.4.7	1/03.2.1/	1-/	0-0	/-8
†	†	G,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″13	03103/1/00	1/03.1.03	1/04.0/.15	0-6	匙	1/1/.7.06	3-7	3-7	
†	†	G,ARD厈宅ў ⮓	宅₇	″14	0310201002	1/02.01.1/	1/04.0/.15	0-7	匙	1/10.1.08	4-2	4-2	/-/0
†	†	G,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″15	0410200//7	1/02.00.0/	1/04.0/.15	1-/	匙	1/10.00.04	5-0		
†	†	G,ARD厈宅ў ⮓	夰≷	″16	03103/4/18	1/03.4.4	1/04.0/.15	0-4	匙	1/1/.7.07	3-7		
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 01 '″11ђ12(	宅₇	″2/	03104/5/5/	1/04.5.12	1/06.0/.2/	1-3	1/08.4.0	1/08.01.13	1-1	0-4	/-5
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 01 '″11ђ12(	宅₇	″20	0410400/16	1/04.00.5	1/06.0/.2/	1-/	1/07.01.14	1/08.5.00	0-5	0-1	/-4
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 02 '″2/ђ20(	夰≷	″21	03108/2/11	1/08.2.0	1/10.0.16	0-8	匙	1/12.5.16	1-3		
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 02 '″2/ђ20(	夰≷	″22	03108/2/13	1/08.2.0	1/10.0.16	0-8	匙	1/12.5.17	1-3		
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 00'″04(	宅₇	″23	0411//6/33	1/1/.6.0	1/10.00.05	0-3	匙	1/11.01.08	0-0	0-0	
†	†	K,ARD嗚唱0 τ 宅ў ⮓ 00'″04(	宅₇	梻24	0311//4/27	1/1/.4.0	1/10.00.05	0-4	匙	1/11.01.1/	0-0	0-0	

Table 2 L-BSE 発症カニクイザル脳内接種群の臨床症状

接種材料	L-BSE 発症サル脳乳剤 P1(#15)			
接種ルート	I.C.			
通番	#34	#35	#22	#23
接種後年数	398	399	684	714
生年月日	2020/7/1	2020/5/1	2010/10/19	2010/11/15
接種日	2021/11/16	2021/11/16	2012/3/28	2012/3/28
発症日	無	無	2013/7/26	2013/5/8
解剖日	2022/12/19	2022/12/20	2014/2/10	2014/3/12
接種日齢	503	564	526	499
接種後発症日数	未発症	未発症	485	406
発症期間	未発症	未発症	199	308
接種後解剖日数	398	399	684	714
臨床症状	臨床症状なし	臨床症状なし	振戦、麻痺、ミオクローヌス、起立不能、反応性低下、認知脳低下	振戦、軽度麻痺、ミオクローヌス、認知脳低下
MRI 所見	脳室拡張軽度	脳室拡張軽度	脳室拡張、萎縮	脳室顕著に拡張、萎縮

Table 3 L-BSE 発症カニクイザル脳内接種群の病変レベル

No.	PID	Symptom	Inoculation site	Pathological findings							
				cerebral medulla				Cerebral cortex			
				Vacuol area	P-Tau	PrP^sc	GFAP	Vacuol area	P-Tau	PrP^{Sc}	GFAP
#34	398	No	Opposing side	±	±	+	+++	±	±	+++	±
			Inoculation site	+	+++	+	+++	++	++	++++	+++
#35	399	No	Opposing side	+	++	+	+	±	++	+	+
			Inoculation site	+	+++	+	+	++	+	+	+
#22	714	Significant	Opposing side	+	±	+	NT	+++	++	+	NT
#23	722	Significant	Opposing side	±	±	++	+++	+++	++	++	++++