I. 総括研究報告書

令和6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）
食用動物等のプリオン病の病態機序およびヒトへの感染リスクの解明に関する研究
(23KA0401)

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

C-BSE の発生は、飼料規制等の管理措置により世界的に制御下にあるが、2021 年、2024 年に英国で感染牛が摘発されたように、感染源は完全には排除されていない。また、非定型 BSE (H-BSE と L-BSE) は高齢牛で自然発生し、L-BSE はヒトに感染するリスクがある。ヒツジのスクレイピーの病原体（プリオン）に多様性があり、異種間伝播により C-BSE 様の病原体が出現することが報告されている。鹿科動物の慢性消耗病（CWD）の病原体にも多様性があり、CWD のヒトへ感染リスクが否定できないとの報告もある。このように C-BSE 収束後も、動物プリオン病によるヒトの健康危害の懸念は常に存在する。最近、ウイルス感染がプリオン発生の誘発要因となる可能性が報告され、非定型 BSE の発生機構として注目されている。プリオン病は致死性の疾患で治療法がないため、食品を介した動物プリオン病のヒトへの伝播リスクの低減に継続的に取り組む必要がある。これまでの本事業の成果として、Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) および Real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) 等、試験管内解析技術が高度化している。これらは、幅広い動物種に対応した高精度な検査法、また、感染動物の病態の解析、ヒトへの感染リスクを含めた異種間伝播能の推定に応用可能である。

本年度は、食用動物等のプリオン病の病態機序およびヒトへの感染リスクの解明に関する研究を進め、以下に挙げる成果を得た。1) C-BSE、定型および非定型スクレイピーを実用レベルの検出感度で検出可能な RT-QuIC 法を構築した。これまでの成果と合わせると、ウシ、シカ、ヒツジとヤギ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。2) Shaking 法は、PMCA 法と同様のプリオン増幅が可能であり、より簡便な試験管内増幅系の開発が進展する可能性がある。3) カニクイザルに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。4) 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、脊髄頸部、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。C-BSE プリオンが経口ルートでウシに感染後、比較的早期から中枢神経系に移行することが判明した。5) H-BSE はカニクイザルに病気を起こさないこと結論できた。

研究分担者

佐藤 豊孝（北海道大学・大学院獣医学研究院・
獣医衛生学教室・准教授）

青島 圭佑（北海道大学・大学院獣医学研究院・
比較病理学教室・講師）

岩丸 祥史（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)

今村 守一 (宮崎大学・医学部・感染症学講座)

萩原 健一 (国立感染症研究所・細胞生化学部
主任研究官)

小野 文子 (岡山理科大学・獣医学部・教授)

A. 研究目的

1980年代に出現した牛海綿状脳症(定型 BSE: C-BSE)は、変異クロイツフェルトヤコブ病を引き起こし世界的に公衆衛生上の脅威となった。C-BSE の発生は、飼料規制等の管理措置により収束したが、2021年に英国で感染牛が摘発されたように、感染源は完全には排除されていない。また、非定型 BSE (H-BSE と L-BSE) は高齢牛で自然発生し、L-BSE はヒトに感染するリスクがある。ヒツジのスクレイピーの病原体(プリオン)に多様性があり、非定型スクレイピーの異種間伝播により C-BSE 様の病原体が出現することが報告されている (Huor et al, 2020; Marin et al, 2021)。鹿科動物の慢性消耗病 (CWD) の病原体にも多様性があること (Tranulis et al, 2021)、CWD のヒトへ感染リスクが否定できないとの報告もある (Hannaoui et al, 2022)。このように C-BSE 収束後も、動物プリオン病によるヒトの健康危害の懸念は存在する。最近、ウイルス感染がプリオン発生の誘発要因になる可能性が報告され、非定型 BSE の発生機構として注目されている (Hara et al, 2021)。プリオン病は致死性の疾患で治療法がないため、食品を介した動物プリオン病のヒトへの伝播リスクの低減に継続的に取り組む必要がある。これまでの厚労科研事業による成果として、Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) および Real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) 等、プリオンの試験管内解析技術が高度化している。これらを応用して、幅広い動物種に対して高精度な検査法の構築が可能であり、また、感染動物の病態の解析、ヒトへの感染リスクを含めた異種間伝播能の推定等が、高いレベルで実施が可能となる。本研究では、これまでの厚労科研事業の成果を基盤として、1) RT-QuIC 等の各種動物プリオン病の検査・診断法への適用と確定検査法の見直

し、2) 異種間伝播によるプリオンの性状変化を解析する試験管内試験系の構築、3) BSE 感染ウシおよびサル病態の解析、4) ウイルス感染がプリオンの新規出現を誘発する可能性、に関して研究を進め、食を介して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資する。

B. 研究方法

1) RT-QuIC 等の各種動物プリオン病の検査・診断法への適用と確定検査法の見直し

1-1) C-BSE, A-および C-Scrapie プリオン検出用の RT-QuIC の条件検討

基質として、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 μ M EDTA, 10 μ M チオフラビン (ThT) を基本とした。プレートリーダーとして 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。

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)。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。

2) 異種間伝播によるプリオンの性状変化を解析する試験管内試験系の構築

2-1) 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°C、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。

2-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

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 にカニクイザル *Prnp* を組み込み (EF1 α 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、メチルセルローズに包埋する、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。

3) BSE 感染ウシおよびサルの病態解析

3-1) C-BSE プリオン経口感染ウシの中核および末梢神経系組織における PrP^{Sc} の検出

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 (PrP^{Sc}) を WB 法で検出されなかった 20 頭の脳幹部、脊髄頸部、脊髄腰部組織を用いて、Protein Misfolding Cyclic

Amplification (PMCA) 法で PrP^{Sc} の検出を試みた。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) の脳乳剤を用いた。各検体は四つ組で、PMCA 法に供した。

3-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

L-BSE 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。

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。

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)

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ール等に従い、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) RT-QuIC 等の各種動物プリオン病の検査・診断法への適用と確定検査法の見直し

1-1) C-BSE, A-および C-Scrapie プリオン検出用の RT-QuIC の条件検討

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 $10^2 \sim 10^4$ 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。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。

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。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 希釈と同程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。

2) 異種間伝播によるプリオンの性状変化を解析する試験管内試験系の構築

2-1) Shaking 法による PrP から PrPres への構造変換の検討

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。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。

2-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

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。

3) BSE 感染ウシおよびサルの病態解析

3-1) C-BSE プリオン経口感染ウシの中脳および末梢神経系組織における PrP^{Sc} の検出

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 PrP^{Sc} を WB 法で検出することで判定していた。WB 法で PrP^{Sc} 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、脊髄頸部、脊髄

腰部検体を用い、高感度の PMCA 法により PrP^{Sc} 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、PrP^{Sc} が検出された。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。

3-2) 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、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。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、さらに PK 抵抗性の性状においても一致していた。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 の PK 抵抗性を比較したところ、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。

発症前群の 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、深淺、軽度麻痺、ミオクローヌス、認知脳低下であった。

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。

D. 考察

1) RT-QuIC 等の各種動物プリオン病の検査・診断法への適用と確定検査法の見直し

1-1) C-BSE, A-および C-Scrapie プリオン検出用の RT-QuIC の条件検討

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。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。

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。

2) 異種間伝播によるプリオンの性状変化を解析する試験管内試験系の構築

2-1) Shaking 法による PrP から PrPres への構造変換の検討

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。

2-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

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。ロ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性質が関わっている可能性がある。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)]ことから、戦略的には可能と考えられるので、引き続き挑戦する。

3) BSE 感染ウシおよびサルの病態解析

3-1) C-BSE プリオン経口感染ウシの中枢および末梢神経系組織における PrP^{Sc} の検出

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 PrP^{Sc} が検出されたが、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 PrP^{Sc} 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 PrP^{Sc} 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。

3-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

L-BSE プリオンが経口ルートを通じ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た。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ることから、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あると考えられる。

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 PrP^{Sc} 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
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。

E. 結論

- 1) C-BSE、定型および非定型スクレイパーを
実用レベルの検出感度で検出可能な RT-
QuIC 法を構築した。これまでの成果と合
わせると、ウシ、シカ、ヒツジとヤギの
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。
- 2) Shaking 法は、PMCA 法と同様の
プリオン増幅が可能であり、より簡便
な試験管内増幅系の開発が進展する
可能性がある。
- 3) カニクイザルに経口的に接種され
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。

- 4) 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、脊髄頸部、脊髄腰部のいずれから、高感度試験管内 PrP^{Sc} 増幅系である PMCA 法により、PrP^{Sc} が検出された。C-BSE プリオンが経口ルートでウシに感染後、比較的早期から中枢神経系に移行することが判明した。
- 5) H-BSE はカニクイザルに病気を起こさないこと結論できた。

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