

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. RT-QuIC 法の阻害物質の除去法の検討

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

Real-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}) の存在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。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。本厚生労働科学研究費では、牛海綿状脳症、ヒツジスクレイピー、およびシカ科動物の慢性消耗病の診断およびモニタリングに使用可能な RT-QuIC 法の構築を進めており、非定型スクレイピー以外の動物プリオン病の診断およびモニタリングに使用可能な RT-QuIC 法はほぼ構築できた。一方で、阻害物質による影響を排除できるならば、RT-QuIC 法の有用性がさらに高まる。そこで、中枢神経系組織を被験試料として診断およびモニタリングすることを想定して、脳組織中の阻害物質の同定とその除去法について検討した。脳組織中の阻害物質はエタノール抽出画分に存在し、組換え PrP (PrP) 結合磁性ビーズによるプルダウン試験により、RT-QuIC 反応は阻害されなくなることから、rPrP と結合することが判明した。rPrP に結合し、ブタノールで抽出される画分に RT-QuIC 阻害活性が認められたことから、阻害物質は脂質であると考えられた。そこで、中枢神経系組織の脂質組成を考慮して、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)、sphingomyelin (SP)、cholesterol (CH) の RT-QuIC 阻害活性を調べたところ、SP に強い阻害活性があることが判明した。SP のコリンを切断する sphingomyelinase で SP を処理した場合 RT-QuIC 反応は起こるようになるが、脂肪酸を切断する sphingolipid ceramid N-deacylase で SP を処理した場合は RT-QuIC 反応は阻害されることから、SP のコリンとスフィンゴシンからなる部位 (lyso-sphingomyelin) が RT-QuIC の阻害活性に重要であることが示唆された。従って、脳乳剤処理を sphingomyelinase で処理することで、RT-QuIC 法の汎用性が高まることが期待される。

A. 研究目的

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。

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。

そこで、本研究では、RT-QuIC の阻害物質の同定およびその除去法の検討を行った。

B. 研究方法

1) スクレイパー試料

スクレイパーマウス順化株であるプリオン 22L 株を使用した。

2) RT-QuIC 法

基質として組換えマウス (Mo) PrP (rMoPrP) を使用した。反応液は 25 mM PIPES, 10 mM Naphosphate, 500 mM NaCl, 100 μ M EDTA, 10 μ M チオフラビン (ThT) を基本とした。また攪拌スピードは 432 rpm とした。基質プレートリダとして TECAN F200 を用いた。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) 脳乳剤のエタノール処理

10%マウス脳乳剤とエタノールを 2:8 の割合で混和し、遠心によりエタノール抽出画分と不溶性画分に分離した。エタノール抽出各画分は乾燥後に少量のエタノールに溶解後に PBS で再構成した。不溶性画分は PBS で再構成した。

4) 脳乳剤の rMoPrP 結合磁性ビーズ処理

10%マウス脳乳剤と rMoPrP を結合した Ni²⁺キレート磁性ビーズを反応させ、rMoPrP に結合する分子をプルダウンした。ビーズをブタノール:メタノール 5:1 (Bu/Me) で処理して、不溶性の画分は PBS で再構成した。可用性の画分は脂質を含む画分として乾燥後に、少量の Bu/Me に再溶解し、PBS で再構成した。

5) 脂質

総リン脂質 (TPLs)、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)、sphingomyelin (SP)、cholesterol (CH) を使

用した。ヒトの脳の脂質組成を参考に、0.0028% ~ 0.00012% の濃度で使用した。

(倫理面への配慮)

動物を使用する実験計画は、北海道大学動物実験委員会で承認されたプロトコールに従って実施した(承認番号 18-0110)。

C. 研究結果

1) エタノール抽出画分の解析 (図 1)

マウス脳乳剤のエタノール抽出画分を再構成した画分は RT-QuIC 反応を完全に阻害した。一方で、エタノール不溶性画分を再構成した画分は RT-QuIC 反応を阻害しなかった。抽出画分と不溶性画分を混和・再構成した画分は RT-QuIC 反応を完全に阻害したことから、脳乳剤中の RT-QuIC 阻害因子はエタノールに可用性の分子であることが判明した。

2) rMoPrP 結合画分の解析 (図 2)

マウス脳乳剤と rMoPrP 結合磁性ビーズを反応させ、rMoPrP と結合する分子を除去した画分は RT-QuIC 反応を阻害しなかった。一方、陰性対照として合成 His-tag ペプチドを結合した磁性ビーズと反応させた画分は RT-QuIC 反応を阻害した。rMoPrP に結合した画分を Bu/Me により抽出される画分 (主に脂質を含む) と抽出されない画分 (主にタンパク質を含む) に分画して、RT-QuIC 反応に加えたところ、Bu/Me 抽出画分に強い RT-QuIC 阻害活性が認められたことから、脳乳剤に含まれる RT-QuIC 阻害物質は脂質であることが示唆された。

3) 脂質生成標品の解析 (図 3, 4)

TPLs、PC、PE、PS、SP、CH を終濃度 0.0028% で RT-QuIC 反応に加えた場合、TPLs、PC、および SP は RT-QuIC 反応が完全に阻害した。一方、これらを終濃度 0.00012% で加えた場合、SP を除く脂質では RT-QuIC 反応を阻害しないか軽度に阻害するのみであったが、SP は RT-QuIC 反応を大きく阻害したことから、脳乳剤に含まれるリン脂質のうち SP は、RT-QuIC の阻害因子となることが明らかとなった。そこで、酵素処理による SP の除去を目的として、SP のコリンを切断する sphingomyelinase、あるいは、脂肪酸を切断する

sphingolipid ceramid N-deacylase 処理が、RT-QuIC に及ぼす影響を検討した。その結果、脂肪酸を切断する sphingolipid ceramid N-deacylase で SP を処理した場合は RT-QuIC 反応は引き続き阻害されるが、コリンを切断する sphingomyelinase で SP を処理した場合は RT-QuIC 反応が復活することから、SP のコリンとスフィンゴシンからなる部位 (lyso-sphingomyelin) が RT-QuIC 反応の阻害活性に重要であることが示唆された。

D. 考察

脳乳剤のエタノール抽出画分とエタノール不溶性画分の再構成により、脳乳剤中の RT-QuIC 反応阻害因子は、エタノール抽出画分に含まれることが明らかとなった。また、脳乳剤中に存在する rMoPrP に結合する因子が RT-QuIC 反応を阻害すること、その阻害因子はブタノール/メタノールで抽出される脂質であると推定された。rMoPrP 結合磁性ビーズにより rMoPrP と共沈降する画分には、SDS-PAGE 後の銀染色で染色される多くの因子が存在しており、特定の阻害因子の同定には至らなかった (結果は示さず)。Hoover らは、脳内のリン脂質が RT-QuIC 反応の阻害物質の一つであることを報告した⁴⁾。また、エタノールで抽出され、ブタノール/メタノールで抽出される脂質にリン脂質が含まれることから、脳内の脂質組成を考慮して、TPLs、PC、PE、PS、SP、CH の RT-QuIC 反応の阻害効果を調べたところ、SP に強い阻害効果があることを見いだした。また、SP のコリン残基とセラミド間を切断する sphingomyelinase で SP を消化すると、RT-QuIC 反応が復活することから、脳乳剤中の SP の除去は、動物プリオン病のモニタリング等に安定して使用可能な RT-QuIC 法の、試料前処理法として有効であるかもしれない。

E. 結論

中枢神経系組織乳剤中に含まれる RT-QuIC の阻害物質が、エタノールに抽出され、rMoPrP と結合し、ブタノール/メタノールにより抽出される画分に存在することを見いだした。候補の一つにリン脂質が想定されたことから、各種リン脂質の精製標品の RT-QuIC 阻害活性を調べたところ sphingomyelin が候補の一つであった。Sphingomyelin のコリン残基を除去することで sphingomyelin の RT-QuIC 阻害活性が低下した。従って、脳乳剤中に含まれる sphingomyelin を除去す

る前処理は、RT-QuIC 反応の改良に有効であるかもしれない。

<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. Hoover CE, Davenport KA, Henderson DM, Zabel MD, Hoover EA. Endogenous Brain Lipids Inhibit Prion Amyloid Formation In Vitro. *J Virol*, 2017 91(9): e02162-16. doi: 10.1128/JVI.02162-16.

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, Erdenebat T, Yamasaki T, Tobiume M, Suga K, Horiuchi M. Monitoring of chronic wasting disease using real-time quaking-induced conversion assay in Japan. *J Vet Med Sci*, 83(11): 735-1739, 2021. doi: 10.1292/jvms.21-0368.
 - 2) Matsuura Y, Miyazawa K, Horiuchi M, Suzuki A, Yokoyama M, Imamura M, Ikeda K, Iwamaru Y.

Extended application of the rapid post-mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease. *Microbiol Immunol*, 66(5): 212-215, 2022. doi: 10.1111/1348-0421.12968.

2. 学会発表

- 1) Erdenebat T, Uwamori N, Tanaka M, Komatsu Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. GABA-negative neuron-prone propagation of prion 22L strain, Asian Pacific Prion Symposium 2021, Nov 7, 2021, Online
- 2) Suzuki A, Sawada K, Erdenebat T, Yamasaki T, Tobiume M, Suga, K Horiuchi M. Monitoring of chronic wasting disease using real-time quaking conversion assay in Japan The 14th Asian Society of Conservation Medicine, Sept 21-24, 2021, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- 3) 上森 望未、田中 美咲、Temuulen ERDENEBAT, 小松 勇介、鈴木 章夫、堀内

基広 プリオン 22L 株のグルタミン酸作動性神経細胞における易増殖性 第 164 回日本獣医学会、2021 年 9 月、酪農学園大学（オンライン）

- 4) 星加 恭、能瀬 絵菜、小松 勇介、堀内 基広、古岡 秀文 プリオン感染動物で見られるシナプス脱落についての比較病理学的検討 第 164 回日本獣医学会、2021 年 9 月、酪農学園大学（オンライン）

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

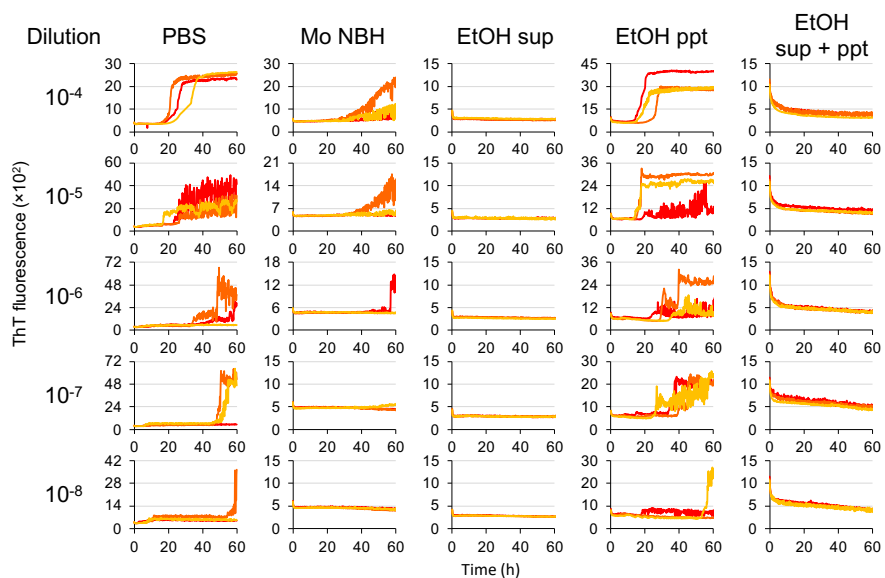


図 1. 脳乳剤のエタノール抽出画分と不溶性画分の RT-QuIC 反応の阻害効果。
 非感染マウス脳乳剤存在下 (Mo NBH) では非存在下 (PBS) と比較して RT-QuIC 反応は顕著に阻害された。非感染マウス脳乳剤の乳剤のエタノール抽出画分 (EtOH sup) は RT-QuIC 反応を完全に阻害するが、エタノール不溶性画分 (EtOH ppt) は RT-QuIC 反応を顕著に阻害しなかった。両者を再構成すると (EtOH sup + ppt) RT-QuIC 反応は阻害された。

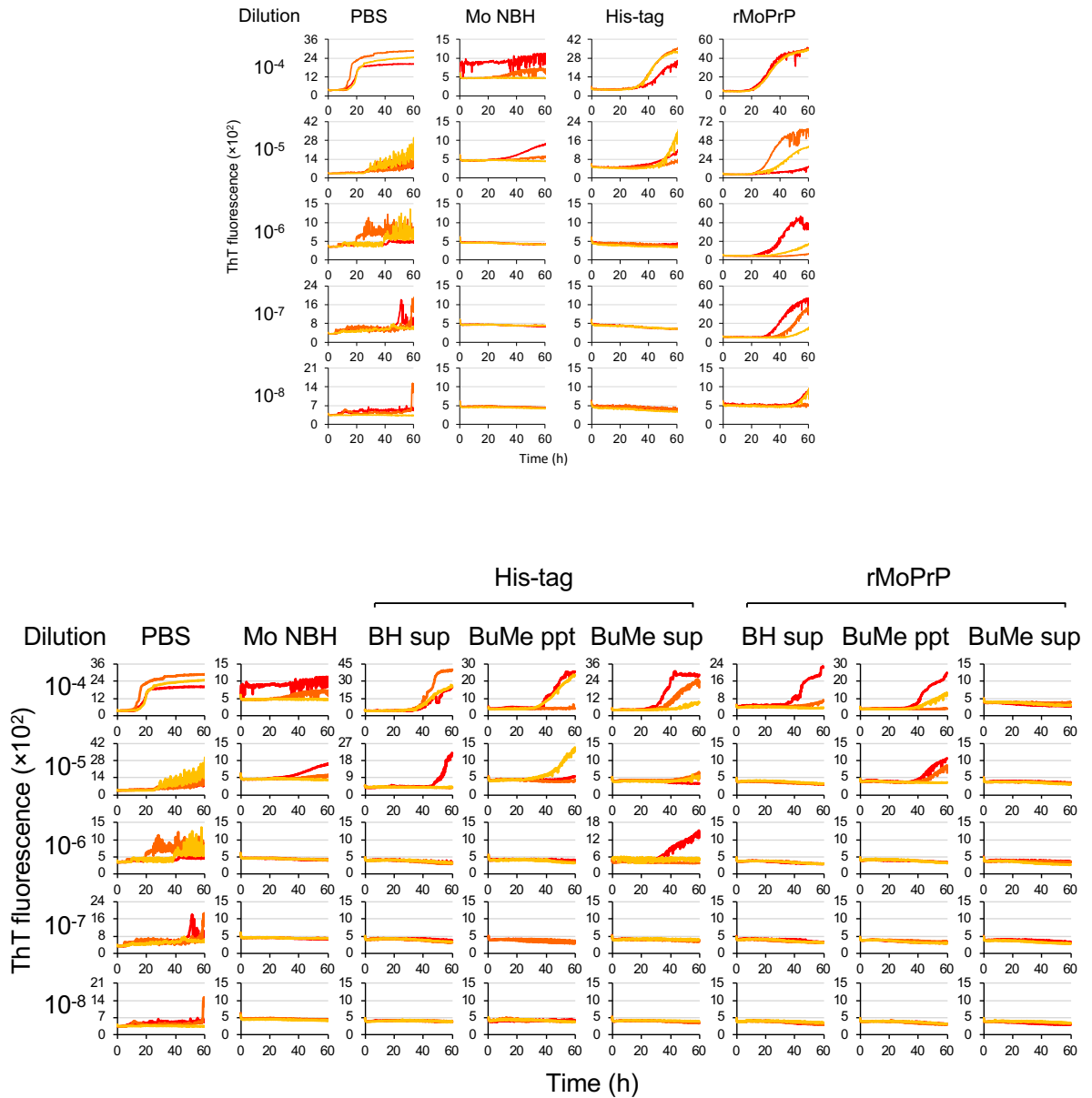


図2. rMoPrP と結合する RT-QuIC 反応阻害因子の解析

(上) 非感染マウス脳乳剤存在下 (Mo NBH) では非存在下 (PBS) と比較して RT-QuIC 反応は顕著に阻害されるが、rMoPrP 結合磁性ビーズを用いて rMoPrP に結合する因子を脳乳剤から除去すると RT-QuIC 反応は回復した (rMoPrP)。陰性対照として使用した His-tag 合成ペプチドを使用し場合は、阻害因子が除去されないために、RT-QuIC 反応は阻害された。

(下) 陰性対照である His-tag ペプチドに結合した画分をブタノール/メタノール (BuMe) で抽出した画分は RT-QuIC 反応を阻害しなかったが (His-tag, BuMe sup)、rMoPrP に結合した画分をブタノール/メタノールで抽出した画分は RT-QuIC を阻害した (rMoPrP, BuMe sup)。一方、ブタノール/メタノールで抽出されない画分 (BuMe ppt) の RT-QuIC の阻害は、His-tag あるいは rMoPrP に結合画分で差が認められなかった。

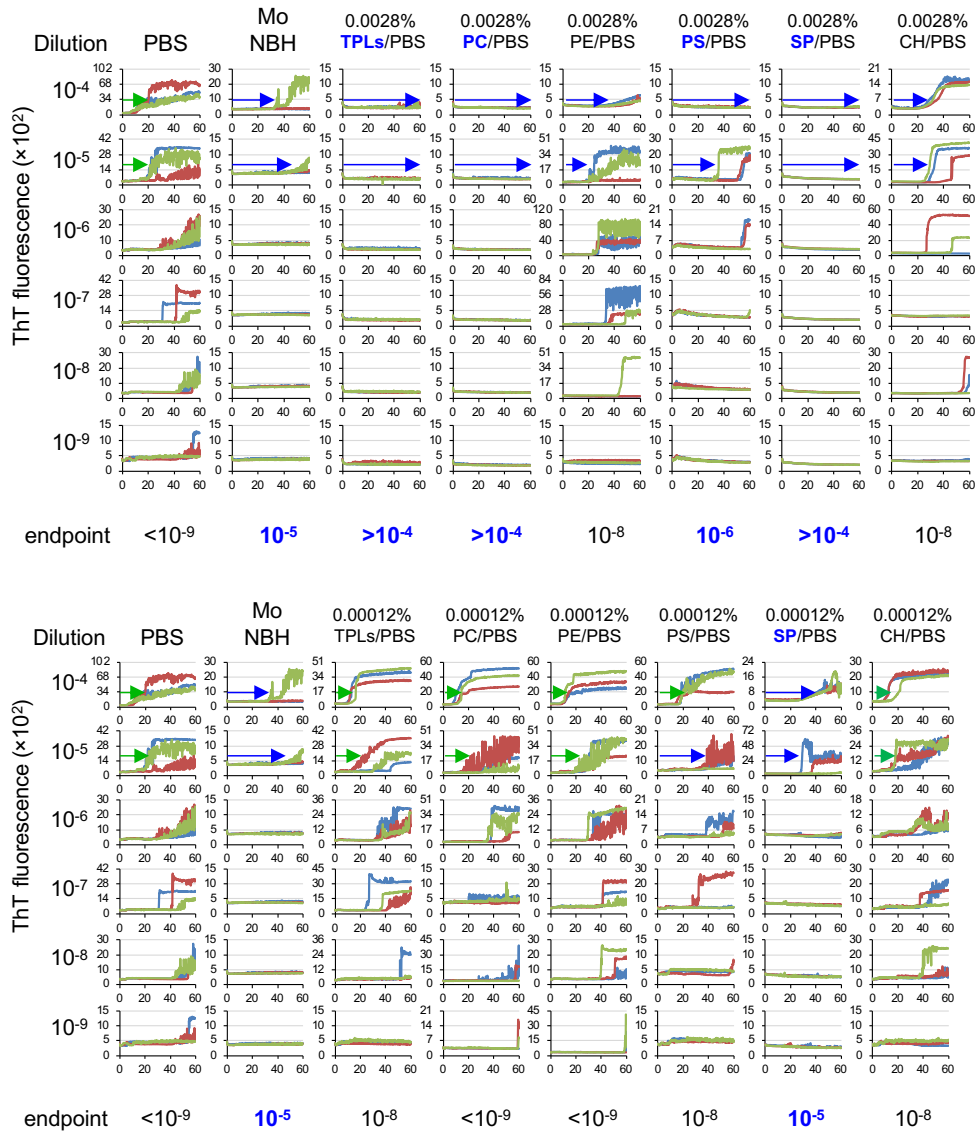


図3. リン脂質のRT-QuIC阻害効果。

中枢神経系組織におけるリン脂質の量を想定して、最高濃度 (0.0028%)、および最低濃度 (0.00012%) 存在下でRR-QuICを実施した。

(上) 高濃度のリン脂質によるRT-QuIC阻害効果。PEを除いて、使用したリン脂質でRT-QuICの阻害が認められた。RT-QuIC反応陽性となる終点 (endpoint) を見ると、TPLs, PC, SPでは反応が完全に阻害されたことから、 10^{-5} 以上の阻害効果が認められた。

(下) 低濃度のリン脂質によるRT-QuIC阻害効果。SPを除いて、リン脂質によるRT-QuIC阻害効果は認められないか (endpoint: $<10^{-9}$)、軽度に阻害されるに留まった (endpoint: $<10^{-8}$)。一方、SPの終点は 10^{-5} であり、 10^{-4} 以上の阻害効果が認められた。TPLs: 総リン脂質、PC: phosphatidylcholine、PE, phosphatidylethanolamine、PS, phosphatidylserine、SP, sphingomyelin、CH, cholesterol。

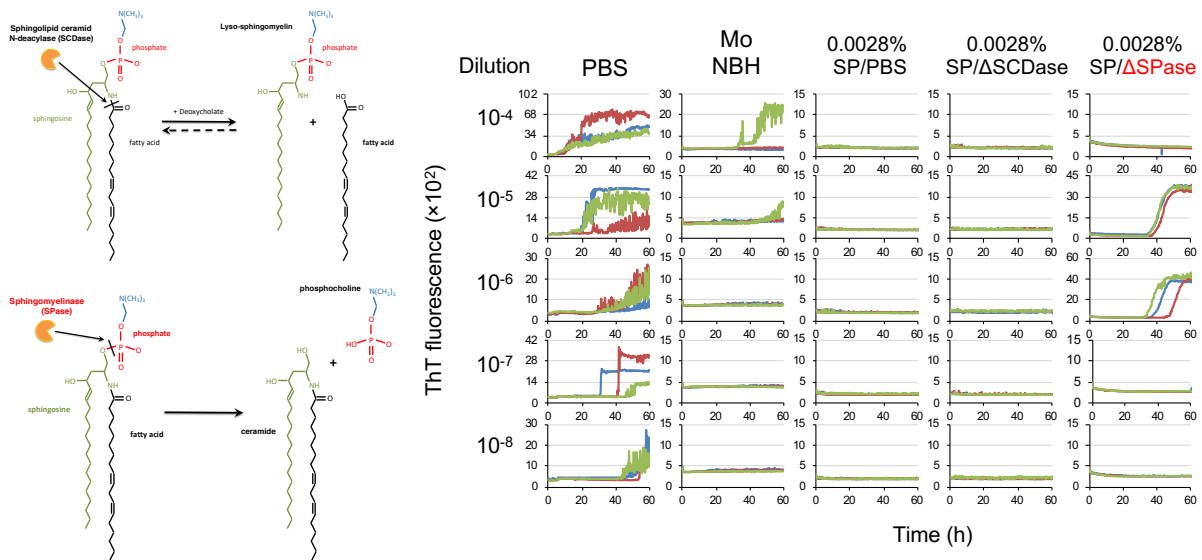


図4. 酵素処理による SP の消化が RT-QuIC に及ぼす影響

SP のコリンを切断する sphingomyelinase、あるいは、脂肪酸を切断する sphingolipid ceramid N-deacylase 処理を行い (右)、その後 RT-QuIC を実施した。脂肪酸を切断する sphingolipid ceramid N-deacylase で SP を処理した場合は RT-QuIC 反応は引き続き阻害されるが (Δ SCDase)、コリンを切断する sphingomyelinase で SP を処理した場合は RT-QuIC 反応が復活した (Δ SPase)。

2. L-BSE 経口接種カニクイザルからのプリオン検出の試み

分担研究者 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 教授
研究協力者 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)

研究要旨

L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口接種したカニクイザルにおいて、安楽死前に定期採材された体液から高感度プリオン検出法である PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法により陽性シグナルが検出されていたが、安楽死の段階では発症は認められず、通常のプリオン検出法でもプリオンの蓄積は認められなかった。そのため、L-BSE プリオンの経口接種によりカニクイザルで感染が成立するか否かは未だ不明である。本研究では、PMCA 法を用いて L-BSE プリオン経口接種サルの脳および脾臓でプリオンが検出できるかを調べた。その結果、非常に微量であるが、経口接種サルの脳および脾臓にプリオンが存在することが示唆された。このことから L-BSE プリオンの経口接種によりサル類で感染が成立する可能性が示された。

A. 研究目的

過去に実施された厚労科研事業において、L-BSE プリオンのヒトへの感染リスクを推定することを目的にカニクイザルへの L-BSE 感染ウシ脳乳剤の経口接種試験が行われた。経口接種された個体について安楽死前に体液が定期採材されていたが、高感度プリオン検出法である PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法により唾液および脳脊髄液で陽性シグナルが検出されていた。しかし、接種から 6 年後に安楽死させた段階では発症は認められず、脳および脾臓においてウエスタンブロッティングおよび免疫染色のいずれにおいてもプリオンの蓄積は認められなかった。そのため、L-BSE プリオンの経口接種によりカニクイザルで感染が成立するか否かは未だ不明である。経口接種サルでは感染が成立しているが、蓄積したプリオンが極微量であるため、検出できないことが原因かもしれない。本研究では、PMCA 法を用いて、プリオンの主要な蓄積部位である脳および脾臓で L-BSE プリオンが検出できるかを調べ、経口接種によりカニクイザルへの L-BSE の感染が成立する可能性を検討する。

B. 研究方法

1) カニクイザル順化 L-BSE プリオンの高感度検出を可能にする PMCA 条件の検討

10 倍段階希釈した L-BSE 脳内感染カニクイザル脳乳剤をシードにして PMCA を行った。検出感度を上げるため、PMCA が終わった反応液の 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 6~8 回行った (連続 PMCA)。PMCA の基質として野生型マウス、ウシプリオンタンパク質 (PrP) 発現形質転換 (Tg) マウス、ヒト PrP 発現 Tg マウス、ハムスター PrP 発現 Tg マウスの脳乳剤を用いた。また、PMCA によるプリオン様プロテアーゼ K 抵抗性 PrP (PrPres) の増幅を促進することが知られている 7 種類の補因子を各種基質に加え、最も増幅効率が良い補因子の組み合わせを検討した。さらに、最適反応温度についても検討した。

2) L-BSE プリオン経口接種カニクイザルの脳および脾臓からのプリオンの検出

2 頭の L-BSE プリオン経口接種カニクイザルの脳および脾臓乳剤をシードとして 1) で決定した反応条件で連続 PMCA を行った。

(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、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) カニクイザル順化 L-BSE プリオンの高感度検出

L-BSE 脳内接種カニクイザル脳乳剤をシード、複数の異なる動物種に由来する PrP を発現する Tg マウス脳乳剤を基質として PMCA を行ったところ、野生型マウス脳乳剤でのみ PrPres の増幅が認められた。次に PrPres の効率的な増幅に必要な補因子の同定を行った結果、digitonin、heparin、L-arginine ethyl ester の組み合わせが最も高い増幅効率を示した (図 1)。また、連続 PMCA を 32°C と 37°C を交互に行うと増幅が安定することが明らかになった。以上の条件で PMCA を 6~8 回繰り返すことで、 10^{-9} 、 10^{-10} 希釈した脳乳剤から PrPres の増幅が認められ、バイオアッセイと同等以上の検出感度が得られた (図 2)。

2) L-BSE プリオン経口接種マカクの脳および脾臓からのプリオンの検出

構築した PMCA 法を用いて L-BSE プリオン経口接種サル 2 個体からの脳および脾臓乳剤をシードとして連続 PMCA を行った。その結果、3 から 7 ラウンドの PMCA により、経口接種サル 2 個体の脳および脾臓乳剤から PrPres の増幅が認められた (図 3)。次に、経口接種個体の脳および脾臓から増幅した PrPres のバンドパターンを脳内接種個体の脳由来 PrPres と比較したところ、経口接種個体から増幅した PrPres のバンドパターンは脳内接種個体の脳由来 PrPres とは異なっていた (図 4)。

D. 考察

L-BSE 感染脳乳剤経口接種サルの脳および脾臓から PMCA により陽性シグナルが検出されたことから、カニクイザルにおいて L-BSE プリオンの経口接種により感染が成立することが示唆された。しかし、PrPres の増幅には早くとも 3 ラウンドが必要であったこと、過去の実験からウエスタンブロッティング(WB)および免疫組織化学染色のいずれも陰性であったことから、これらの組織に含まれるプリオンは極微量であると考えられた。今後経口接種個体の脳乳剤をサル等に脳内接種し、感染性のあるプリオンが含まれていることを確かめる必要があるだろう。

非接種サルの脾臓乳剤からも PrPres が増幅し (図 3)、再現性も認められている (データは省略)。この脾臓は 22 歳齢個体に由来するものであるため、高齢により脾臓でプリオンが自発発生し

たのかもしれない。

経口接種サル脳および脾臓乳剤から増幅した PrPres の WB バンドパターンは脳内接種サル脳乳剤で増幅した PrPres とは異なっていた。経口接種により L-BSE プリオンがパイエル板等を介して体内に入り、末梢神経から中枢神経系に至る過程で、L-BSE プリオンが増幅環境へ順化することで性状が変化した可能性、または L-BSE プリオンに含まれる substrain が増幅したこと等が考えられる。

E. 結論

これまでに L-BSE プリオンの経口接種によりネズミキツネザルで感染が成立した事例は報告されているが、よりヒトに近いカニクイザルで感染が成立した報告はなく、本研究がはじめての例であると考えられる。自然発生すると考えられる L-BSE がヒトにも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、今後も現状の BSE 対策を維持する必要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) Imamura M, Tabeta N, Iwamaru Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R. Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system. *Biochem Biophys Res Commun.* 613:67-72, 2022

2) Takatsuki H, Imamura M, Mori T, Atarashi R. Pentosan polysulfate induces low-level persistent prion infection keeping measurable seeding activity without PrP-res detection in Fukuoka-1 infected cell cultures. *Sci Rep* 12(1) 7923, 2022

2. 学会発表

1) スクレイピー感染ヒツジ脳には複数のプリオン株が混在している. 今村守一, 宮澤光太郎, 森剛志, 高月英恵, 新竜一郎. 九州微生物研究フォーラム 2021 2021 年 9 月 11 日

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

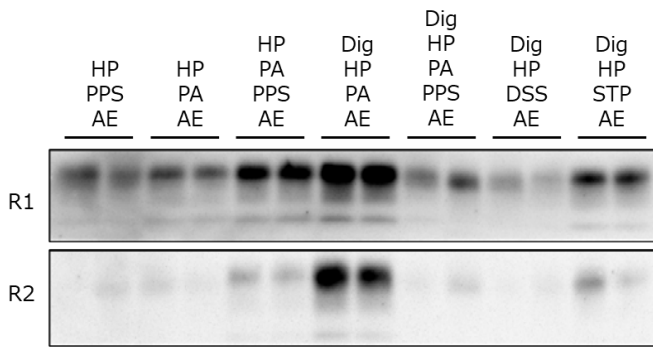


図1. カニクイザル順化L-BSEプリオンの増幅を促進する補因子の同定. 野生型マウス脳乳剤に様々な促進補因子候補を組み合わせて加え、L-BSE脳内接種カニクイザル脳乳剤をシードにしてPMCAを行った。PMCAの結果の一例を示す。ジギトニン、ヘパリン、アルギニンエチルエステル、ポリAの組み合わせが最も効果的であった。
Dig: ジギトニン、HP: ヘパリン、PA: ポリA、AE: アルギニンエチルエステル、PPS: ポリリン酸ナトリウム、DSS: デキストラン硫酸ナトリウム、STP: 4-スルホテトラフルオロフェニルエステル

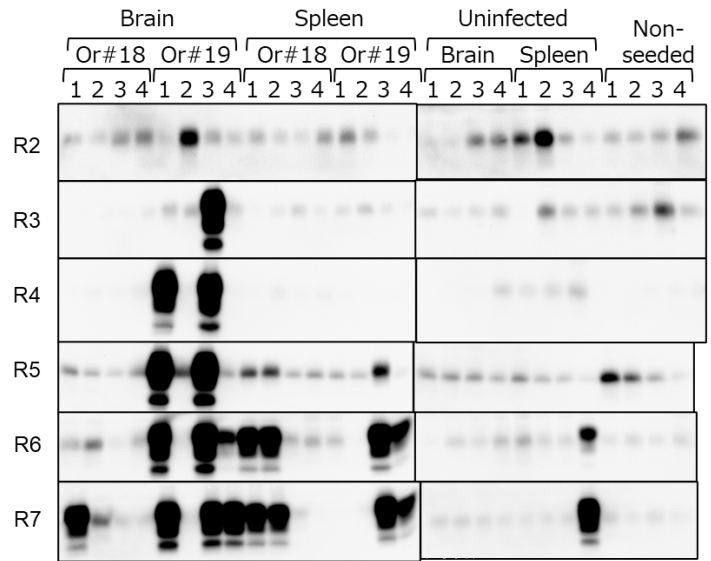


図3. PMCAによるL-BSE感染脳乳剤経口接種カニクイザル脳および脾臓からのPrPresの生成. L-BSE経口接種サル2頭 (Or#18, Or#19)と非接種サル (脳と脾臓は別個体由来) の10%脳および脾臓乳剤をシードにしてquadruplicateで7ラウンドまで連続PMCAを行った。経口接種サルは2個体とも脳および脾臓でPrPresの増幅が認められた。また、非接種サル脾臓でもPrPresの増幅が認められた。

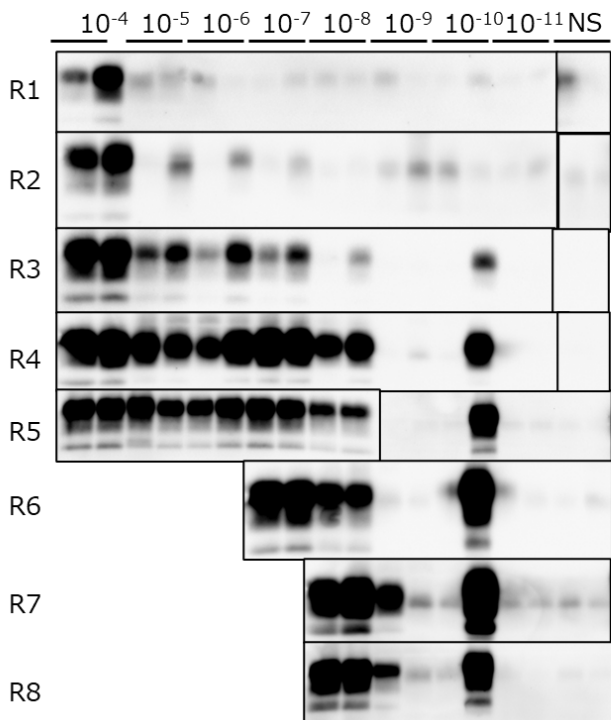


図2. カニクイザル順化L-BSEプリオンの高感度検出. 10% L-BSE脳内接種カニクイザル脳乳剤の10倍段階希釈液をシードにして奇数ラウンドは32℃、偶数ラウンドは37℃で8ラウンドまで連続PMCAを行った。上記の数値は反応液 (10%脳乳剤) あたりのシード脳乳剤の希釈倍率を示す。10⁻¹⁰希釈した脳乳剤からPrPresの増幅が可能であった。

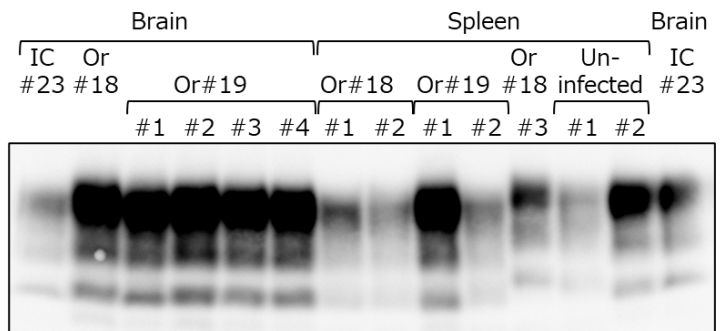


図4. L-BSEプリオン経口または脳内接種サルの脳および脾臓から増幅したPrPresのバンドパターンの比較. L-BSE経口接種サル2頭 (Or#18, Or#19)と脳内接種サル (IC#23) の10%脳および脾臓乳剤をシードにして増幅したPrPresをWBした。#1~#4は同一のシードであるが、それぞれ異なるチューブで増幅したものであることを示す。

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)

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 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死を行い病理検索に供した。臨床症状は自傷行為が頻繁に観察された個体はいたが、持続的な神経症状は認められなかった。

人への感染性プリオンの経口感染リスクを評価する目的で、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、継続的な検体採取および臨床病態の観察を行っている。また、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、継続的な検体採取を行い、発症初期 (接種後 1 年以内) の解剖を実施する。

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#26 は 2021 年 11 月 15 日 (2212 日目 : 6 年 1 か月) に解剖を行った。

L-BSE 経口接種群 : 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。

L-BSE 脳内接種群 : 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。

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。

脳内接種 : 塩酸ケタミンとキシラジン麻酔下で、無菌的に皮膚を切開し、頭蓋骨に直径 2 mm の穿孔部を作製し、片側被殻に 10%BSE 発症サル脳乳剤 200 µL を接種する。接種後 3 日間抗生物質および、鎮痛剤を投与した。

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) 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

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) H-BSE 接種群

H-BSE を脳内接種および経口投与を行い、経過観察を行っている 4 頭において、接種後 4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死を行い病理検索に供した。臨床症状は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。

2) L-BSE 接種群

L-BSE サル継代脳乳剤の大量経口投与を行った 2 頭は 1 年 2 か月、脳内接種を行った 2 頭は 4 か月を経過し、明らかな神経症状は認められなかった。

D. 考察

H-BSE プリオン脳内接種を行った 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 カ月目に解剖を実施した。いずれの個体も持続的進行性の神経症状は認められなかった

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。L-BSE サル継代脳乳剤の大量経口投与により食の安全とともに、クールー病のリスクについて検討を行う。また、L-BSE サル継代脳乳剤接種カニクイザルについて発症初期の病理検索を行うことにより、異常プリオンタンパク伝達機序の解明を行う。

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が認められず、C-BSE、L-BSE に比べ、霊長類への病原性は低いと考えられた。

孤発性 CJD と同様の病態が発現する L-BSE 感染サルの病態観察を継続しており、発症機序の解明、人への感染リスクおよび、治療研究モデルと

しての有用性について検討を進めている。

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

4. 非定型 BSE 感染カニクイザルの病理学的解析

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。これらより、H-BSE プリオンの脳内接種または経口投与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

1) 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 のサルへの伝達性ならびに伝達した場合の病理学的特徴を明らかにする。

2) 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。近年のジビエの拡大から、本邦における CWD 清浄確認は重要である。本研究では東京都および千葉県に生息する野生シカの検体採取体制の確立、シカにおけるプリオン清浄調査を行う。

3) プリオン病は生体内の正常型プリオンタンパク質が異常型に置換され蓄積することで誘導される。*Prnp* ノックアウトマウス等が樹立され正

常プリオンの生物学的な役割の検討がなされているが、明らかではない。本研究では、加齢性の変化である老人斑形成時における正常型プリオンの局在の解析を中心に、生体内での正常型プリオンタンパク質の生物学的な機能を明らかにしていく。

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つて

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・いすみ市近郊である。本研究では両地域に生息するキョン脳組織の採取、収集体制を確立し、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ブロット法を用いたプリオンの有無について検索を行う。

3) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

脳組織中の正常型プリオンタンパク質の免疫組織化学的手法を用いた局在の検討は少ない。正常型プリオンタンパク質は病理標本中では不安定で、長時間のホルマリン固定組織では免疫組織化学的手法を用いた検出は難しい。我々は、脳組織の固定にパラフォルムアルデヒド (PFA) を用い、迅速な固定を行うことで安定して正常型プリオンタンパク質を検出できることを示してきた。PFA を用いて固定された組織標本を用いて、正常型プリオンとアミロイドβの共染色を行い、それぞれのタンパク質の局在の関連を検討した。

(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。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プリオン病に特徴的

な変化は認められていない。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。一方グリア細胞等のマーカーである GFAP 染色を行ったところ、正常の脳組織に比べ GFAP 陽性細胞の増生、集簇巣が H-BSE 投与サルにおいて認められた。(図 1)

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、30 頭の脳組織の採取を行った。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となり、36 頭の脳組織を得た。

3) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

PFA 固定された脳組織の同一切片上で、正常型プリオンが検出される部位と検出されない部位が共存することを明らかにした。In situ hybridization 法を用いて *Prnp* mRNA を検出したところ、免疫染色により正常型プリオンが検出できない部位でも mRNA は存在していた。また、正常型プリオンタンパク質が検出されない部位では、コアを有するアミロイドβのプラーク形成が誘導されていた。また、神経細胞の正常型プリオンタンパク質陽性部位と陰性部位について LC/MAS 解析を行い、存在量に変動のあるタンパク質約 140 種を確認した。(図 2)

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、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誘導されていなかった。一方、GFAP 陽性細胞の増生、集簇が脳内接種、経口投与の両サルで認められている。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の検討と同時に、GFAP陽性細胞の増生および集簇が投与されたH-BSE由来プリオンに由来するものか、他要因に由来するものかの検討が必要と考えられた。

2) キョン検査体制の確立

東京都・大島町で採取された30頭、千葉県・いすみ市で採取された36頭のキョン脳組織のウエスタンブロット法による検索ではプリオン陽性個体は見つからなかった。両地域では、キョンの生息域の拡大が続いており、今後も継続的な調査が必要と考えられた。

3) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

同一脳組織内で神経細胞の正常型プリオンタンパク質発現陽性部位と陰性部位が存在することが見いだされた。陰性部位ではコアを有するアミロイドβ陽性の老人斑が形成されており、同老人斑形成への正常型プリオンタンパク質の関与について解析が必要であることが示唆された。

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。東京都・大島町30頭、千葉県・いすみ市36頭の脳組織の解析ではプリオン陽性個体は認められなかった。

3) 神経変性疾患における正常型プリオンタンパク質の解析

脳組織のPFA固定により安定的に免疫組織化学的手法により正常型プリオンタンパク質が検出できた。正常型プリオンタンパク質陰性部位では、コアを有するアミロイドβプラークが形成されていた。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi RH, Yokotsuka M, Tobiume M, Sato Y, Hasegawa H, Nagao T, Gouras GK. Accumulation of cellular prion protein within β -amyloid oligomer plaques in aged human brains. *Brain Pathol.* 2021 Sep;31(5):e12941. 2)
- 2) Suzuki A, Sawada K, Erdenebat T, Yamasaki T, Tobiume M, Suga K, Horiuchi M. Monitoring of chronic wasting disease using real-time quaking-induced conversion assay in Japan. *J Vet Med Sci.* 2021 Nov 16;83(11):1735-1739.
- 3) Zhang Y, Ozono S, Tada T, Tobiume M, Kameoka M, Kishigami S, Fujita H, Tokunaga K. MARCH8 Targets Cytoplasmic Lysine Residues of Various Viral Envelope Glycoproteins. *Microbiol Spectr.* 2022 Feb 23;10(1):e0061821.

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

SARS-CoV-2の検出方法 令和3年9月7日 特願2021-145458

2. 実用新案登録

図 1

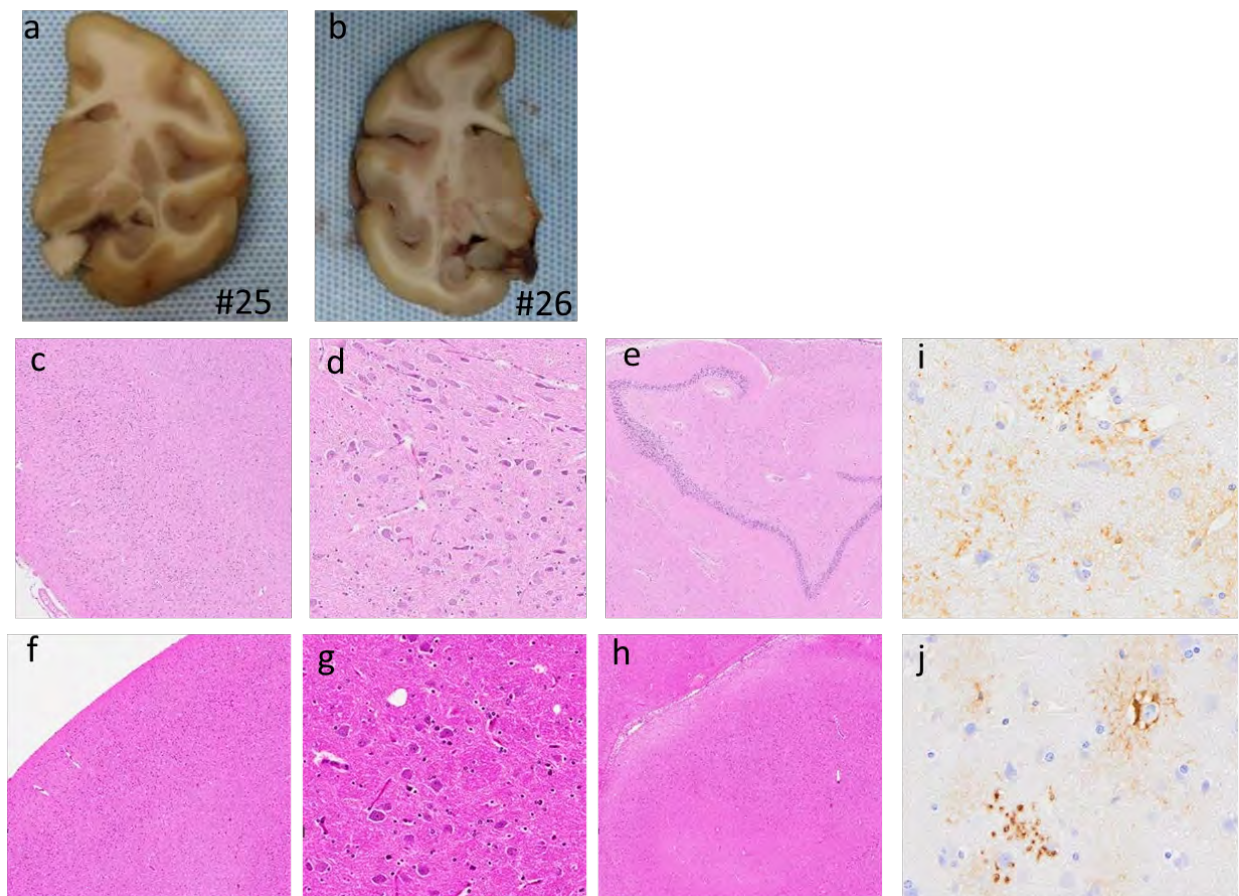
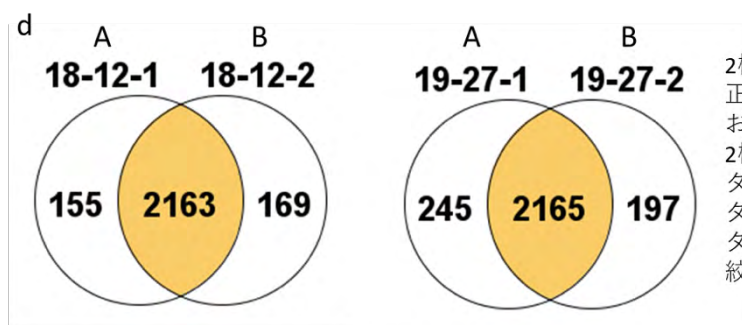
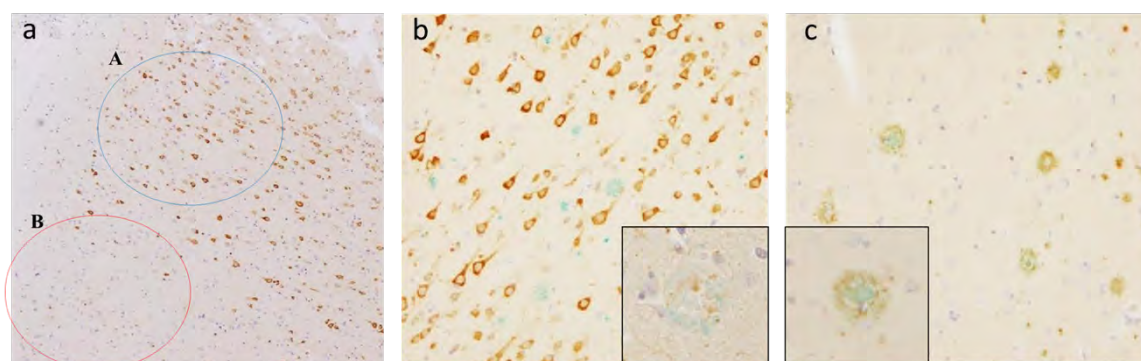


図 1 H-BSE由来プリオン脳内投与および経口投与サル脳所見。マクロ像 a:脳内接種、b:経口投与サル。皮質の萎縮、脳室の拡大は認めない。HE染色：脳内接種サル、大脳皮質(c)、被殻(d)、海馬(i)、経口投与サル 大脳皮質(f)、被殻(g)、海馬(h)。空胞変性、神経細胞の脱落を認めない。GFAP染色：脳内接種(i)、経口投与(j)。GFAP強陽性細胞の増加と集簇巣を認める。

図 2



2検体 (18、19) の正常型プリオンタンパク質保存部位 (A) および消失部位 (B) の発現タンパク質比較。2検体の比較から、正常型プリオンタンパク質保存部位 (A) で検出されたタンパク質、および消失部位で検出されたタンパク質はそれぞれ70分子程度に絞り込まれた。

a: 抗プリオン抗体による免疫染色像。同一検体上で正常型プリオン保存部位および消失部位を確認した。
 b, c: 正常プリオンタンパク質 (茶) とアミロイドβ (緑) の共染色像。正常型プリオンタンパク質消失部位ではコアを有するアミロイドβプラークが形成されていた。

5. サル馴化 BSE プリオンが持続感染可能な培養細胞の開発 および 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

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 (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

これまで研究班においてはウシ由来の 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。このサル馴化 BSE プリオンが持続感染可能な培養細胞があれば、これまでに得たサル個体レベルでの実験成果を培養細胞レベルの実験へ発展でき、その意義は大きい。昨年度までに細胞バンクから入手可能な幾つかの候補細胞を取り寄せて、サル馴化 C-BSE プリオンの持続感染が起こるか否かを調べた結果、IMR32 細胞にカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子を導入した細胞が有望であることを見出した。本年度は、サル馴化 C-BSE プリオンがこの細胞において安定的に増殖できることを明らかにした。さらに、今後 IMR32 細胞を利用していくことを考えると、内在性のヒト・プリオン蛋白質の干渉を避けたい。そこで、IMR32 細胞からヒト・プリオン蛋白質遺伝子 (*PRNP*) をゲノム編集法により欠損させることに着手した。

また、非定型 H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルの飼育・観察期間が 5 年を超えたため、実験計画に沿って安楽殺に処し、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。その結果、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。

A. 研究目的

プリオン研究における各種の実験動物を活用した *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ために不可欠な実験系である。一方、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。また、ヒトのプリオンについては、マウス馴化後の CJD プリオン (Fukuoka 1 株) がマウス N2a 細胞や GT1 細胞、マウスの正常型プリオン蛋白質を人為的に発現させたウサギ RK13 細胞において持続的に感染・増殖できることが知られている [Vet Res. 2008;39:10. DOI:10.1051/ vetres:2007049]。しかし霊長類の培養細胞で、BSE プリオンあるいは霊長類へ伝

播・馴化させた BSE プリオンが安定して持続感染できる細胞は、研究分担者が知る限りにおいてこれまで実用的なものは無い。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実験系が開発できれば、研究班が研究リソースとして保有するプリオン株を使った研究を *in vitro* 実験系へ展開できるようになる。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細胞を探索した。その結果、昨年度の予備的な探索において、ヒト神経芽細胞腫に由来する IMR32 細胞が有望であることを見出した。本年度は、この細胞においてサル馴化プリオンが安定的に持続感染するか否かを引き続き検討した。

また、C-BSE プリオンと変異型 CJD との因果関係

は疫学的にも霊長類モデル実験系によっても示されているが、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。H-BSE プリオンのヒトへの感染性は不明であることから、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、ヒト・モデルによる感染リスクの評価に取り組んだ。本年度は、H-BSE プリオンを脳内接種した個体 1 頭の上位脳でのプリオンの増殖の有無をウエスタンブロット法 (WB 法) により検索した。(脳内接種した計 2 頭のうち、1 頭は昨年度に分析を済ませている。)

B. 研究方法

1) カニクイザルへ馴化させたプリオンが増殖する培養細胞の開発

昨年度に、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、これらの細胞へ PiggyBac プラスミドベクター (System Biosciences, LLC) を用いてカニクイザルの *Prnp* のプリオン蛋白質 (PrP) コード領域の cDNA を安定導入した。細胞の培地に C-BSE プリオンを感染させたカニクイザル (サル ID #007) の 10%脳ホモジネート (リン酸緩衝液) を添加し、以後、培養・継代を通常の細胞培養法により繰り返した。最初に添加したカニクイザル脳ホモジネートが十分に希釈されるまで繰り返し継代後、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調べた。その結果、検討した細胞の中で、IMR32 細胞がプリオンの持続感染能を持つ有望な細胞であることが昨年度にわかった。

本年度は、細胞の継代をさらに重ねることで、IMR32 細胞においてサル馴化 C-BSE プリオンが安定的に増殖できるか否かを追跡した。また、IMR32 細胞はヒト・プリオン蛋白質遺伝子 (ヒト *PRNP*) を持ち、ヒトの正常型プリオン蛋白質 (ヒト・PrP^C) を発現している。今後の研究に IMR32 細胞を利用する場合にヒト・PrP^C の干渉が起こらないように、Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Clontech-Takara) を用いて内在性のヒト *PRNP* の PrP コード領域の欠失を試みた。

2) カニクイザルへの H-BSE プリオンの脳内接種実験 (初代伝播) の生化学分析

H-BSE 罹患ウシの脳乳剤を脳内接種したカニクイザル 1 頭 (サル ID #025、接種/投与と経過観察は、小野、柴田による) 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 L-BSE プリオンを脳内接種 (初代伝播) したカニクイザル (#015)、および陰性対照として非感染ザル (#1421209068) の大脳皮質を用いた。

(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) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

① カニクイザルの *Prnp* を導入した 6 種の培養細胞 (N2a、IMR32、PG-4(S+L-)、LLC-RK1、RK13、CAD) を C-BSE を感染させたカニクイザルの脳ホモジネートとともに培養し、その後、脳ホモジネートを含まない培地で継代したところ、IMR32 細胞の複数の培養バッチで一定量の PrP^{Sc} がウエスタンブロット法により検出された (令和 2 年度報告書に記載のとおり)。その後、本年度も継代培養を続けて、継代を重ねることで PrP^{Sc} が消失するか否かを追跡した。その結果、継代を重ねても、あるいは細胞を凍結保存した後、解凍・培養再開をしても、PrP^{Sc} は持続的に検出された。すなわち、カニクイザルの *Prnp* を導入した IMR32 細胞では、サル馴化 C-BSE プリオンの安定した持続感染・増殖が起きていると考えられた。

② カニクイザルの *Prnp* を導入した IMR32 細胞は、外来的に導入・発現させたカニクイザル PrP^C とともに、内在性のヒト PrP^C も発現してい

る。①において検出された PrP^{Sc} が、カニクイザル PrP^C から生じた PrP^{Sc} なのか、あるいはヒト PrP^C から生じた PrP^{Sc} なのか、という点を 3F4 抗体と 1E4 抗体を用いたウェスタンブロットにより調べた。その結果、カニクイザルとヒトの PrP に共通して反応する 3F4 抗体を用いると（当然ながら）IMR32 細胞の PrP^{Sc} が検出されたが、1E4 抗体（ヒト PrP への反応が強い）抗体を用いると IMR32 細胞の PrP^{Sc} に由来するバンドは微弱であり、従って 3F4 抗体で検出された PrP^{Sc} は、主としてカニクイザル PrP^C を基質として生じた PrP^{Sc} であることがわかった [図 1]。

③ 上記②のように、IMR32 細胞はヒト PrP^C も発現している。細胞を今後の研究に活用することを考えると、内在性のヒト PRNP を欠失させておくことが望ましい。そこで研究協力者の既報 (DOI:10.1248/bpbreports.2.5_73) に準じた方法により、CRSPR/Cas9 を用いるゲノム編集を試み、IMR32 細胞の PRNP の PrP コード領域から約 0.7kb を欠失させたノックアウト細胞の作出に成功した。PrP を発現しないノックアウト細胞に、カニクイザルないしマウスの Prnp をプラスミドベクターにより導入し、これらの外来 PrP が発現されることを確認した [図 2]。

2) カニクイザル (H-BSE 脳内接種) の生化学分析

H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザル (#025) の脳の一部位への 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。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、#025 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（海馬サンプルに 3F4 陽性バンドが検出されたが、陽性対照の C-および L-BSE 感染ザルの 3F4 陽性バンドとは泳動度が異なり、また再現性が無いので、PrP^{Sc} のバンドではないと考えている。この点は、さらなる追試を行いたい。）[図 3]。なお、#025 の Prnp の PrP コード領域は、Ensemble データベース (ENSMMUG00000019949) と一致していることを DNA 配列分析で確認した。

D. 考察

サル馴化 C-BSE プリオンが、ヒト神経芽細胞腫由来の IMR32 細胞において安定的に持続感染・増殖することを見出した。IMR32 細胞が、サル馴化 L-BSE プリオンの持続感染能も有するか否かとい

う点は興味深く、今後、検討する予定である。もしも、C-BSE プリオン、L-BSE プリオンともに IMR32 細胞で増殖させることができれば、動物個体の実験に比べて、PrP のアミノ酸多型が両プリオンの増殖に及ぼす影響などの点を *in vitro* 実験系で検討できるようになる。

また、ウシ由来の H-BSE プリオンをカニクイザルへ脳内接種後（＝初代伝播）5 年 4 ヶ月経過した時点で安楽殺に処して採材したサルの脳の一部位には、ウェスタンブロット法で検出可能な PrP^{Sc} は蓄積していなかった（C-BSE および L-BSE プリオンをウシからカニクイザルへ初代伝播／脳内接種した被接種カニクイザル脳では 3 μg 前後の脳組織中の PrP^{Sc} が明確に検出される感度レベルで、H-BSE 感染カニクイザルでは 3 mg の脳組織を分析にかけても PrP^{Sc} は検出されなかった）。昨年度には、H-BSE プリオンを脳内接種後 4 年 10 ヶ月経過した時点で安楽殺に処したカニクイザル (#024) の脳の一部位の PrP^{Sc} の蓄積をウェスタンブロット法で検索したが、PrP^{Sc} は #025 と同じく検出限界以下だった（令和 2 年度報告書）。なお、観察期間中の #025 には、明らかにプリオン病が疑われる外見的な神経症状は認められなかった（小野、柴田による）。以上から、本研究班で実施した C-、L-および H-BSE プリオンのウシからカニクイザルへの初代伝播実験において、高効率で感染が成立すると期待される‘脳内接種’ルートを採用しても、H-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播効率は C-および L-BSE プリオンよりも格段に低いと判断された。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 (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（脳内接種後 122 ヶ月時点、DOI:10.1038/srep11573）、という報告は、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。

E. 結論

以下の結論を得た。

- ・カニクイザル Prnp を導入・発現させた IMR32 細胞が、サル馴化 C-BSE プリオンを持続感染・増殖できることを見出した。
- ・H-BSE プリオンを脳内接種（ウシからサルへの初代伝播）したカニクイザル #025 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ブロット法により検索した。PrP^{Sc} の蓄積はウエスタンブロット分析の検出限界以下だった。

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

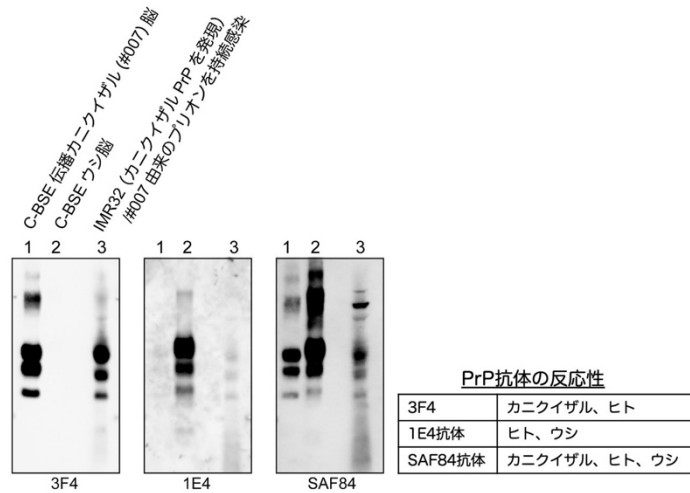
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし



※ サル馴化 C-BSE プリオンをカニクイザル *Prnp* を導入した IMR32 細胞に感染させると、3F4 抗体陽性の PrP^{Sc} が増殖する（左側パネル lane 3；3F4 抗体は、カニクイザルとヒトの PrP に共通して結合する）。この PrP^{Sc} と 1E4 抗体（カニクイザル PrP への反応性は弱い）との反応は弱い（中央パネル lane3）ことから、IMR32 細胞で増殖している PrP^{Sc} は、主としてカニクイザル PrP^C から生じていると考えられる。ウシ C-BSE 感染脳（各パネルの lane 2）はコントロール・サンプルであり、3F4 に結合せず、1E4 と SAF84 に結合する。

図1 カニクイザル *Prnp* を導入した IMR32 細胞にサル馴化 C-BSE プリオンを感染させると、サル型 PrP^{Sc} が増殖する。

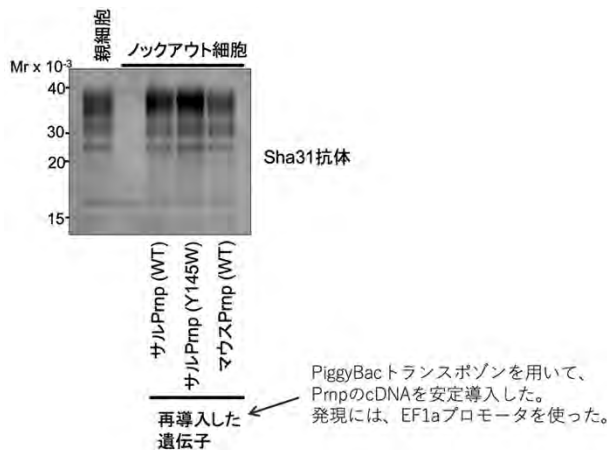
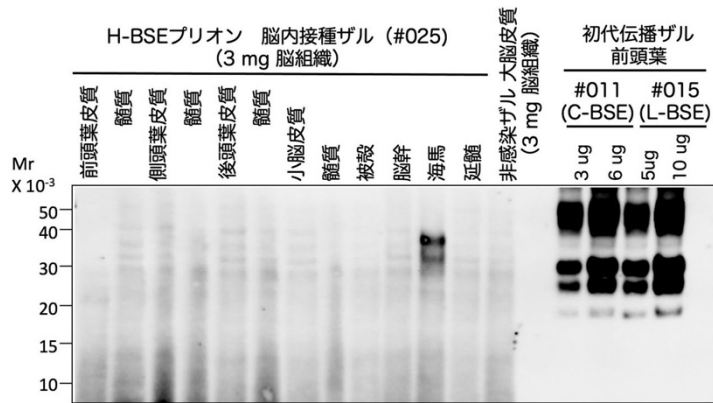


図2 ヒト *PRNP* をノックアウトした IMR32 細胞でのカニクイザル PrP^C の人為的発現



※ 海馬サンプルで抗プリオン蛋白質抗体 (3F4) 陽性のバンドが検出されたが、陽性対照 (C-および L-BSE の初代伝播ザル脳組織) のバンドとは明らかに泳動度が異なり、PrP^{Sc} ではないと考えられた。

図3 H-BSE プリオン脳内接種ザル (#025) の脳の PrP^{Sc} のウエスタンブロット分析

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

これまでに BSE 感染モルモットでは PrP^{res} による VGLUT1 陽性ニューロン（グルタミン酸作動性ニューロン）の傷害が小脳に加え、視床後外側腹側核、後内側腹側角および網様核においてもみられることを報告した。これら研究を踏まえ、本研究では、ハムスターに異なるプリオン株 4 株を接種し、プリオン株ごとに特徴的な病態、すなわち傷害されるニューロンの違いについて検討した。プリオン感染動物は、LBSE、CWD、263K ハムスター馴化プリオン株およびマウス Obihiro 株感染ハムスターを用い、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロンについて、主に大脳皮質、海馬、視床において傷害されるニューロンの違いについて検討した。また、ニューロンの性状を特徴づける神経伝達物質を分泌するシナプス前ニューロンに加え、その受容体についても検討した。いずれのプリオン感染ハムスターでは、PrP^{res} の蓄積が黒質に強くみられたが、ドーパミン作動性ニューロンはよく維持されていた。また GABA 作動性ニューロンも、PrP^{res} 沈着部位を含めよく維持されていた。このことは、ドーパミン、GABA 共に前シナプス側傷害はほとんどなく、PrP^{res} に抵抗性を有するものと考えられた。一方、いずれのプリオン株感染ハムスターについても、大脳皮質を中心に PrP^{res} 沈着部位でグルタミン酸作動性ニューロンの減少がみられた。さらに、LBSE と CWD プリオン株感染ハムスターでは、大脳皮質および海馬において AMPA 型受容体の一つである GLuR1 発現に変性・崩壊がみられた。以上より、プリオンによるニューロンの選択的傷害に加え、後シナプス側レセプターのプリオン株による感受性（脆弱性）の違いが明らかになった。プリオン株ごとに傷害されるニューロンの性状に加え、その受容体について検討することは、プリオン株ごとの病態の違いを説明する可能性がある。

A. 研究目的

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みられることを報告した。このことは、プリオン沈着による VGLUT1 陽性ニューロン（グルタミン酸作動性ニューロン）の選択的減少・脱落に起因していた。昨年度は、このような病変が小脳に加え、視床後外側腹側核、後内側腹側角および網様核においてもみられることを報告した。このように、一見無秩序に広がるプリオン病変も、部位によっては特定の性状を有するニューロンが選択的に傷害されていることがわかった。異なるプリオン株をハムスターに接種するとプリオン株により異なる病態がみられる。このような病態の違いは、プリオンの生化学的性状に起因するが、病理学的な違いがどのように生じるかについての詳細は不明である。そこで、LBSE、CWD、263K ハムスター馴化プリオン株およびマウス

Obihiro 株感染ハムスターにおいて、プリオン株により傷害される前シナプス側ニューロンの性状に違いがあるかについて検討した。またさらにその結果を踏まえて、関連する後シナプス側受容体の変化についても検討を実施したので報告する。

B. 研究方法

1) 供試動物及び接種材料

接種動物は Syrian ハムスターと Hartley モルモット（いずれも 4～5 週齢、雌、日本 SLC、静岡）を供した。

ハムスターへの接種は LBSE、CWD、263K ハムスター馴化株およびマウス Obihiro 株を使用した。モルモットには BSE モルモット馴化株を使用した。いずれの株についても 3 ないし 4 匹にそれぞれ接種した。陰性対照としてしてハムスターとモルモットを 2 匹と 1 匹それぞれ供した。

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4 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および110、VGLUT1、VGLUT2、VGAT、DAT、VMAT2、NMDAR1、GluR1、GluR2、D1RおよびD2R抗体を用いた。12F10、110はPrP^{res}、VGLUT1とVGLUT2、VGAT、DATおよびVMAT2はそれぞれのグルタミン酸、GABA、ドーパミンおよびセロトニン作動性ニューロンマーカーとして使用した。D1RとD2R抗体はドーパミンレセプターマーカーとして使用した。NMDAR1およびGluR1、R2抗体はグルタミン酸受容体のうちNMDA型受容体とAMPA型受容体のマーカーとしてそれぞれ使用した。二次抗体としてヒストファインペルオキシダーゼ標識抗体を使用した。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°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、肉眼所見および発症日数

いずれの動物も発症時、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。剖検時、肉眼的には脳外観に著変は認められなかった。おおよその発症日数についてはFig.1にまとめた。

2) 組織学的・免疫組織化学的検索

いずれの感染動物についても、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、小脳の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。それぞれの部位による空胞の程度は、プリオン株により異なっていた(Fig.2)。

PrP^{res}沈着は、空胞変性部位及び程度に一致してみられた。ハムスターではいずれのプリオン株についても、線条体、黒質にPrP^{res}の沈着が強くみられたが、ドーパミン作動性ニューロンマーカーで

あるDAT抗体の陽性像は対照動物と同様によく保たれていた(Fig.3)。また、大脳皮質ではPrP^{res}の沈着程度にかかわらず、GABA作動性ニューロンマーカーであるVGATの減弱はみられなかった。BSEプリオン感染モルモットでは、線条体でのプリオン沈着は軽度で、ドーパミン作動性ニューロンはよく維持されていた。大脳皮質ではPrP^{res}沈着が高度の部位においてもGABA作動性ニューロンはよく維持されていた。一方、感染ハムスター、モルモットでは、プリオン株にかかわらずPrP^{res}沈着程度に一致して、大脳皮質のグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーであるVGLUT1陽性像が減弱していた。セロトニン作動性ニューロンのマーカーとして使用したVMAT2抗体はハムスター、モルモットに交差性を示さず、結果は得られなかった。

今回使用したドーパミンレセプターマーカー(D1RとD2R抗体)はハムスターおよびモルモットに特異性を示さず、ドーパミン作動性ニューロンの後シナプス側レセプターについては結果が得られなかった。グルタミン酸作動性ニューロンの後シナプス上のレセプターマーカーのうち、NMDAR1抗体の発現はハムスタープリオン株による違いはみられず、また、BSE感染モルモットについてもプリオン沈着部位を含めてよく維持されていた。GluR1抗体の発現はプリオン株により違いがみられた。263KおよびマウスObihiro株ではPrP^{res}沈着部位においても対照ハムスターと同様の発現を呈した。一方、LBSE株、CWD株では、発現様式に変化がみられ、微細顆粒状の変性産物が大脳皮質、海馬を中心にみられた(Fig.4)。また、これらレセプターの足場タンパクの一つであるPSD95の発現はLBSE株、CWD株を含め変化はみられなかった(Fig.4)。

D. 考察

異なるプリオン株をハムスターに接種すると株により潜伏期、傷害される部位や程度に異なる病態みられる。プリオン病はシナプスの異常やシナプス伝達の障害が本質的な病態であり、プリオン株により病態が異なることは、基本的に傷害されるシナプスの性状や機能の特徴が異なることを意味する。本研究では、プリオン株による病態の違いが生じる機序について、株ごとに何らかの法則性がある可能性、すなわちプリオン株により傷害されるニューロンの性状あるいは機能が異なる可能性を検証することを目的として実施した。ドーパミン作動性ニューロンは一般的に行動を起こす時に活動する動機付けニューロンとされ、黒質と腹側被蓋野にみられ、線条体へ投射する。プリオン感染ハムスターでは、PrP^{res}の蓄積が黒質

に強くみられたが、ドーパミン作動性ニューロンはよく維持されていた。また、シナプスやニューロン機能の抑制に関与する GABA 作動性ニューロンも、PrP^{res} 沈着部位を含めよく維持されていた。このことは、ドーパミン、GABA 共に前シナプス側傷害はほとんどないものと考えられた。一方、後シナプス側のドーパミンレセプターについてはハムスターに交差性が得られず検索できなかったが、症状との関連を検討する上でも、GABA レセプターとともに更なる検討が必要と考えている。

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質であり、標的細胞のグルタミンレセプターにより制御されている。これまでに、BSE 感染モルモットの小脳に加え、視床の VPL、VPM、網様核において、PrP^{res} 沈着部位に一致して VGLUT1 作動性ニューロンの選択的な消失・減少が見られた。いずれのプリオン株感染ハムスターについても、大脳皮質を中心に PrP^{res} 沈着部位でグルタミン酸作動性ニューロンの減少がみられた。グルタミン酸受容体サブタイプのうち、イオンチャネル型受容体には、AMPA 受容体と NMDA 受容体が知られている。前者は、中枢神経系における興奮性シナプス伝達の大部分を担うとされ、病的状態としてはてんかんと関連が知られている。後者は、記憶・学習、神経回路の形成に関与し、認知症の関連で知られている。今回検討したプリオン株のうち、LBSE と CWD プリオン株感染ハムスターでは、大脳皮質および海馬において AMPA 型受容体の一つである GLuR1 の発現に変性・崩壊がみられている。このことは、グルタミン作動性ニューロンの減少のみならず、プリオン株によってはレセプターにも傷害が生じていることが明らかになった。臨床学的な検討も今後必要と考えられる。また、NMDA 型受容体およびそれを支える足場タンパクである PSD95 はいずれのプリオン株感染ハムスターの空胞変性を示すニューロンにおいても維持されていた。これらのことから、受容体によって PrP^{res} に対して感受性（脆弱性）に違いがあることが示された。

今後、さまざまな神経伝達物質を分泌するシナプ

ス前ニューロンとその受容体を検証することは、プリオン株による臨床症状を含む病態の違いを説明する可能性があると考えられた。

E. 結論

プリオン感染ハムスターでは、ドーパミン作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンは PrP^{res} 沈着部位を含めよく維持されていた。一方、今回検索したいずれのプリオン株もグルタミン作動性ニューロンに傷害をもたらすとともに、LBSE および CWD プリオン株では AMPA 型受容体の一つである GLuR1 レセプターにも傷害が生じていた。以上より、プリオンによるニューロンの選択的な傷害に加え、後シナプス側レセプターのプリオン株による感受性（脆弱性）の違いが明らかになった。プリオン株ごとに神経伝達物質に加え、その受容体について検討することは、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。

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

星加恭、能瀬絵菜、小松勇介、堀内基広、古岡秀文、プリオン感染動物で見られるシナプス脱落についての比較病理学的検討、第 164 回日本獣医学会（江別）、2021 年 9 月

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

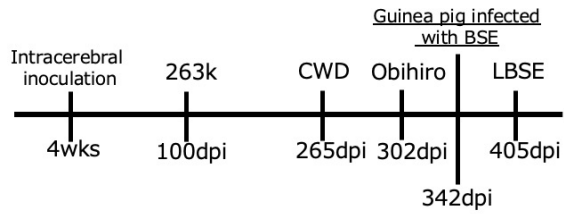


Fig. 1. 本研究で使用したプリオン株および発症日数を示す。

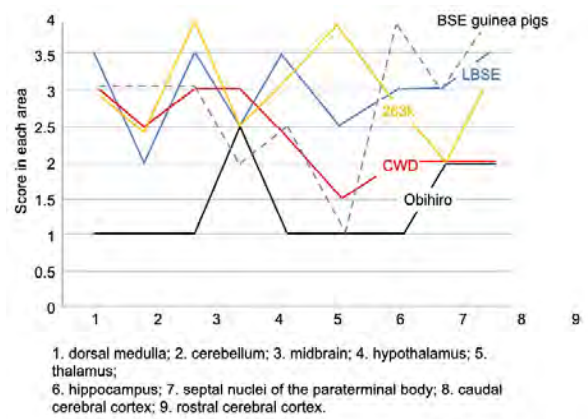


Fig. 2. プリオン株ごとの Lesion profile を示す。

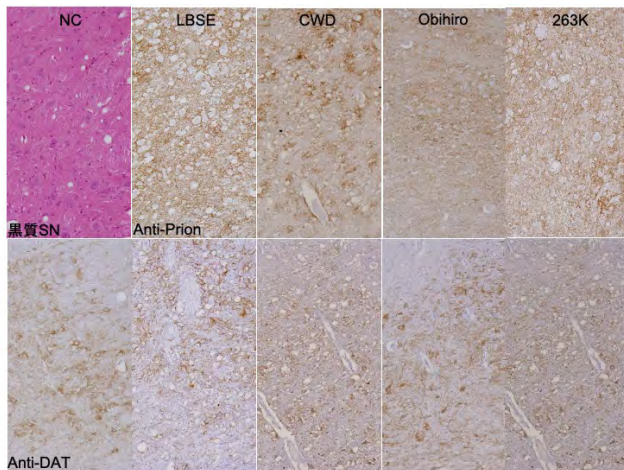


Fig. 3. 黒質に PrP^{res} の沈着が強くみられたが、ドーパミン作動性ニューロンマーカーである DAT 抗体の陽性像は対照動物と同様によく保たれていた。

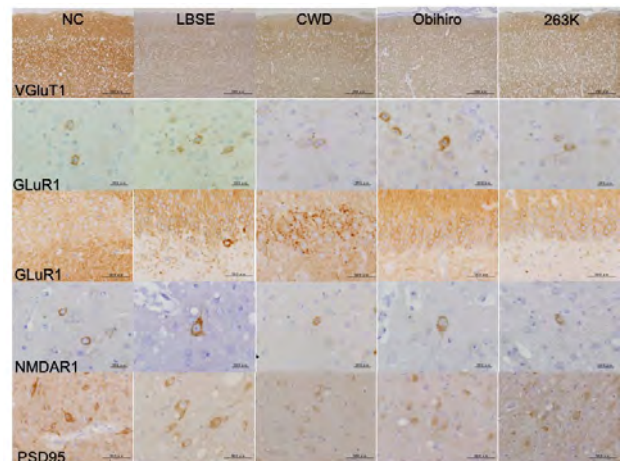


Fig. 4. グルタミン酸作動性ニューロンは PrP^{res} 沈着部位でいずれも減少していた。GLuR1 は LBSE 株, CWD 株プリオン株で、大脳皮質、海馬で微細顆粒状の変性産物がみられた。NMDAR1, PSD95 の発現はプリオン株による違いはみられなかった

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 人獣共通感染症研究領域
新興ウイルスグループ グループ長補佐

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

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 (TgHu129MM) 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、①L-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与 153 ヶ月後に解剖したウシの中樞神経系における異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の蓄積、②スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脳とリンパ組織における PrP^{Sc} の蓄積を調べたが、どちらの実験においても標的組織から PrP^{Sc} は検出されなかった。以上の結果から、L-BSE プリオンのウシ間での経口伝播リスクと従来型スクレイピープリオンのヒトへの伝播リスクは極めて小さいと考えられた。

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公衆衛生上極めて重要である。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 の伝達試験を実施し、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 感染ウシ脳乳剤経口投与 153 ヶ月後のウシ中樞神経系における PrP^{Sc} の蓄積評価
L-BSE 感染ウシ脳乳剤 (50 ㏍) を経口投与 153 ヶ月を経たウシ (#9383) を解剖し、全身諸臓器を採取した。本年度は、ウェスタンブロット (WB) 法を用いて中樞神経系における PrP^{Sc} の蓄積を評価する。

2) スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を脳内接種した TgHu129MM マウスにおける PrP^{Sc} の蓄積評価
国内、米国および英国で摘発された従来型スクレ

イピー感染ヒツジ（国内6症例、米国1症例、英国1症例）と実験感染によって得た CH1641-like スクレイピー感染ヒツジ(1症例)の5または10%脳乳剤(20 μ L)を TgHu129MM マウスの脳に接種し、行動異常や消瘦等のプリオン病に特徴的な神経症状を示すかを最長800日間観察する(表1)。経過観察後、脳および脾臓等のリンパ組織を採取し、WB法と免疫組織化学染色(IHC)により PrP^{Sc}の蓄積を調べる。スクレイピープリオンのヒトへの伝播性を更に詳細に調べるため、採取した組織の乳剤を調製し、再度 TgHu129MM マウスの脳に接種し、経過を観察する。

(倫理面への配慮)

本実験におけるプリオンの取扱いは、(国研)農研機構動物衛生研究部門のバイオセーフティ委員会にて承認されている。また、本実験は、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)」を遵守している。ウシおよび遺伝子改変マウスを用いた動物感染実験は、農研機構の動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会にて承認されており、「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)」を遵守して実施する。

C. 研究結果

1) L-BSE感染ウシ脳乳剤経口投与153ヶ月後のウシ中枢神経系における PrP^{Sc}の蓄積評価
大脳皮質、脳幹、延髄門部、小脳皮質、小脳髄質、脊髄頸膨大および脊髄腰膨大の組織乳剤を調製し、WB法を用いて PrP^{Sc}の蓄積を調べたが、いずれの組織からも PrP^{Sc}は検出されなかった(図1)。解剖2ヶ月前まで4ヶ月毎に採取したウシの唾液からは PMCA法を用いても PrP^{Sc}は検出されなかった(表2)。

2) スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を脳内接種した TgHu129MM マウスにおける PrP^{Sc}の蓄積評価
スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を接種800日後まで観察したが、神経症状を呈する個体は現れなかった。CH1641-like スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脳および脾臓からは PrP^{Sc}は検出されなかった。従来型スクレイピー感染脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脳では WB法と IHC法のいずれの方法を用いて

も PrP^{Sc}は検出されなかったが、Shikaoi-3の脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脾臓および小腸パイエル板のリンパ濾胞中心の濾胞樹状細胞において IHC法により陽性反応が認められた(図2)。一方、同じ組織を用いた WB法ではプロテイナーゼ K (PK) 抵抗性の PrP^{Sc}は検出されなかった(図3)。以上の結果を考慮し、Shikaoi-3脳乳剤接種マウスの脳および脾臓乳剤を TgHu129MM マウスに再接種し(2継代め)、最長800日間観察後に解剖し、脳を採取して WB法を用いて PK抵抗性の PrP^{Sc}の蓄積を調べたが、PrP^{Sc}は検出されなかった(図4)。

D. 考察

我々はこれまでの L-BSE感染ウシ脳乳剤10 μ gを経口投与したウシ(4頭)と50 μ gを経口投与したウシ(2頭)の中枢神経系における PrP^{Sc}蓄積を調べた結果、50 μ g投与の1頭のみから PrP^{Sc}を検出できた。この結果から、L-BSEプリオンのウシ間における経口伝播の可能性は極めて低いことが示された。一方、L-BSE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^{Sc}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。

TgHu129MM マウスモデルによるスクレイピープリオンの伝達試験結果から、CH1641-like スクレイピープリオンのヒトへの伝達リスクは極めて低いと考えられた。また、8株の異なる由来の従来型スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を TgHu129MM マウスに接種したが、脳内に PrP^{Sc}を蓄積するマウスは確認できなかった。一方、Shikaoi-3脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脾臓は、IHC法では PrP^{Sc}陽性反応が認められるが、WB法では PK抵抗性の PrP^{Sc}が検出されない(図2および3)。この脾臓組織の感染性を確認するため、再度 TgHu129MM マウスに接種したが、全ての個体の脳内に PrP^{Sc}の蓄積は認められなかったことから、Shikaoi-3を含めた従来型スクレイピー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。

E. 結論

L-BSEプリオンのウシ間での経口伝播の可能性は極めて低いと結論づけられた。TgHu129MM マウスモデルを用いた伝播試験の結

果を踏まえると、CH1641-like スクレイピープリオンや従来型スクレイピープリオンのヒトへの伝播リスクは極めて小さいことが示唆された。

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

- 1) Matsuura Y, Miyazawa K, Horiuchi M, Suzuki A, Yokoyama M, Imamura M, Ikeda K, Iwamaru Y. Extended application of the rapid post-mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to

chronic wasting disease. Microbiol Immunol doi:10.1111/1348-0421.12968. 2022.

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

株名	PrP 多型	スクレイピーの分類	起源	接種脳乳剤濃度
Fukuoka	ARQ/ARQ	従来型	日本	10%
Oita	ARQ/ARQ	従来型	日本	10%
Kanagawa	ARQ/ARQ	従来型	日本	5%
Tokachi	ARQ/ARQ	従来型	日本	5%
Shikaoi-S2	ARH/ARQ	従来型	日本	5%
Shikaoi-S3	VRQ/ARQ	従来型	日本	5%
G3571	ARQ/ARQ	従来型	米国	5%
UK-7	ARQ/ARQ	従来型	英国	5%
Sh294	ARQ/ARQ	CH1641	実験感染	5%

表1 TgHu129MM マウスへの接種試験に用いたスクレイピー脳乳剤の情報

PrP 多型はコドン 136, 154 および 171 のアミノ酸を示す。

従来型スクレイピーは全て野外発症例を使用した。

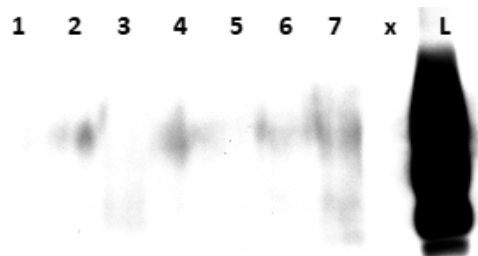


図1. 脳および脊髄のWBの結果

1 大脳皮質, 2 脳幹, 3 延髄門部, 4 小脳皮質, 5 小脳髄質, 6 脊髄頸膨大, 7 脊髄腰膨大

Lは陽性対照 (L-BSE 感染脳)。#9383は10 mg、陽性対照は0.5mg 脳当量を泳動した。抗体はT2-HRPを使用した。

ウシ番号	PMCA	2020/4	2020/9	2020/12	2021/9	2021/9	陽性対照
#9383	R1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	R2						

	R3																
	R4																
	R5																
	R6																
	R7																
	R8																

表2 PMCA法を用いたウシ#9383の唾液からのPrP^{Sc}検出

PMCAはduplicateまたはで実施した。R1-R4のPMCA産物のWB法によるPrP^{Sc}の確認はしていない(NT)。塗り潰し(黒)はPrP^{Sc}陽性、白抜きはPrP^{Sc}陰性を示す。

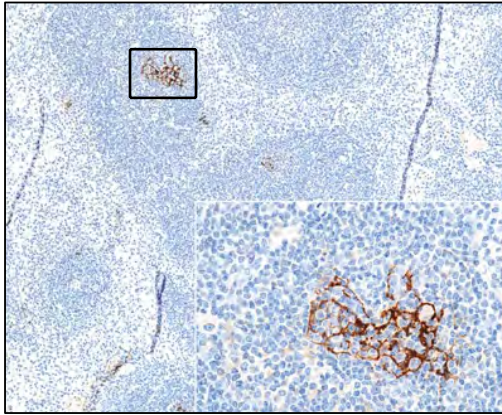


図2 TgHu129MM マウスの脾臓の PrP^{Sc} の検出 (IHC)
 Shikaoi-3 ヒツジ脳乳剤を接種した TgHu129MM マウスの脾臓をホルマリン固定後にパラフィン切片を作製し、抗 PrP 抗体 (T1) を用いて免疫染色を実施した。リンパ濾胞中心の濾胞樹状細胞 (FDC) に陽性反応が認められる。右下は四角で囲んだ部分の拡大図を示す。

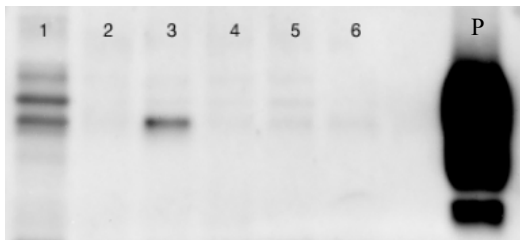


図3 TgHu129MM マウスの脾臓の PrP^{Sc} の検出 (WB)
 10 mg 組織当量を電気泳動し、検出には抗 PrP 抗体 (3F4) を使用した。No.1~6 の6 個体を WB に供した。P は陽性対照を示す。

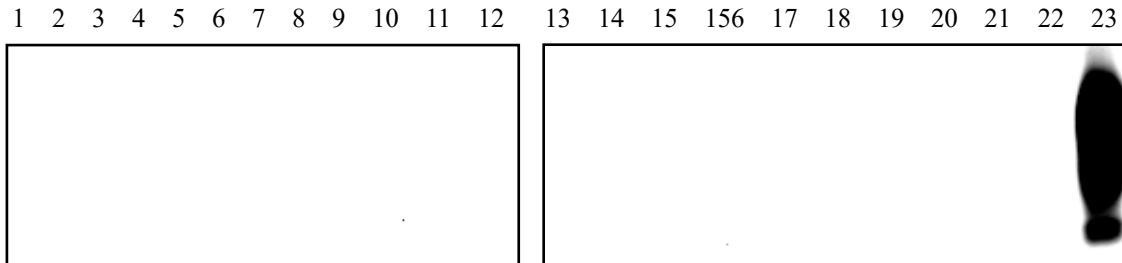


図4 TgHu129MM マウス (2 継代め) の脳における PrP^{Sc} の検出 (WB)

10 mg 脳当量を電気泳動し、検出には抗 PrP 抗体 (6H4) を使用した。
 No.1~8 は、IHC で脾臓に PrP^{Sc} が確認されたマウスの脳 (PrP^{Sc} は陰性) を接種した個体を示す。
 No.9~23 は脾臓を接種した個体を示す。
 P は陽性対照を示す。