

# I. 総括研究報告書

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
非定型BSE等動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究  
(20KA1003)

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究院 教授

研究要旨

英国で発生して世界に拡散した定型BSE (C-BSE) は、飼料規制等の管理措置により発生は制御下にある。しかし、病型が異なる非定型BSE (L-およびH-BSE) が世界各地で摘発され、依然不安視されている。ヒツジのスクレイピーは、病原体“プリオン”に多様性があり、ヒトに感染しうるプリオン株の存在は否定できない。鹿科動物の慢性消耗病 (CWD) は、2016年以降、北欧3国で発生が報告され、感染拡大が懸念されている。2018年にはアルジェリアでラクダのプリオン病が報告された。このようにC-BSE発生収束後も、動物プリオン病は発生しており、ヒトの健康危害の懸念が絶えない。最近、非定型スクレイピーがC-BSEの起源となることが報告された (Huor et al., PNAS, 2020)。プリオン病は致死性の神経変性疾患で治療法がないため、C-BSE再興の防止、並びに非定型BSEを含め動物プリオン病のヒトへの感染リスクの低減を目的とした管理措置は依然として食の安全性を確保する上で重要である。本年度は、非定型BSE等の動物プリオン病のヒトへの感染リスクの推定と低減に資する研究を進め、以下に挙げる成果を得た。1) 中枢神経系組織におけるReal-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) の阻害因子の一つとして、リン脂質の一種である sphingomyelin が同定された。2) Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) により、経口接種サルでの脳および脾臓に微量のプリオンが検出されたことから、L-BSEプリオンは経口接種によりサル類に感染が成立する可能性が示された。3) 一方、H-BSEプリオンを脳内あるいは経口投与したカニクイザルは、これまでに接種後4年10ヶ月から6年1カ月に安楽死して病理学および生化学的解析を行っているが、伝達を示す証拠は得られていない。4) カニクイザルのプリオンタンパク遺伝子を安定発現させた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。5) BSEおよびCWDプリオン感染ハムスターでは、グルタミン作動性ニューロンが傷害されることを見出した。6) L-BSEのウシでの感染試験の結果から、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。7) ヒトプリオンタンパク質遺伝子過発現マウス (TgHu129MM) を用いた感染実験から、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。

研究分担者

新 竜一郎 (宮崎大学・医学部・感染症学講座教授)	飛梅 実 (国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官)
小野 文子 (岡山理科大学・獣医学部 准教授)	萩原 健一 (国立感染症研究所・細胞生化学部)

## 第1室室長)

古岡 秀文(帯広畜産大学・畜産学部・基礎獣医学研究部門 教授)

宮澤 光太郎(国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 主任研究員)

### A. 研究目的

1980年代半ばに出現した牛海綿状脳症(定型BSE、以下“C-BSE”)は、変異クロイツフェルトヤコブ病(vCJD)を引き起こし、世界的に公衆衛生上の脅威となった。食用に供される牛のスクリーニング並びに特定部位の除去によるヒトへの感染リスクの低減措置、並びに、動物由来飼料の使用規制により、vCJDとC-BSEの発生は収束している。一方、能動的サーベイランスにより非定型BSE(H-BSEとL-BSE)の存在が明らかとなった。非定型BSEは高齢牛で孤発する可能性があり、C-BSEの起源となる可能性も指摘されている。ヒツジのスクレイピーは、病原体“プリオン”に多様性があり、ヒトに感染するプリオン株の存在は否定できない。鹿科動物の慢性消耗病(CWD)は、北米と韓国で発生していたが、2016年以降、北欧3国で発生が報告され、感染拡大が懸念されている。2018年にはアルジェリアでラクダのプリオン病が報告された。このようにC-BSE発生収束後も、動物プリオン病は発生しており、ヒトの健康危害の懸念が絶えない。プリオン病は致死性の神経変性疾患で治療法がないため、C-BSE再興の防止、並びに非定型BSEを含め動物プリオン病のヒトへの感染リスクの低減を目的とした管理措置は重要である。最近、非定型スクレイピーがC-BSEの起源となることが報告された(Huor et al., PNAS, 2020)。平成29-31年度に実施した厚労科研事業では、CWD病原体がC-BSE様の病原体に変化することを見出した。従って、C-BSE病原体に限らず、動物プリオン病の病原体の性状が変化してヒトへ感染することを想定した対策が必要となる。各種動物プリオン病のヒトへのリスク、および、ヒトに感染性を有する病原体に変化する可能性に関する知見は、適切な管理措置の根拠となる。必要となる科学的知見の収集・蓄積には、各種動物プリオン病の高精度検出・性

状解析法の整備と感染動物における病態解析が必要である。そこで本研究では、1) 各種動物プリオン病の高精度検出系の整備、2) 非定型BSE感染ウシおよびサル病態解析、3) プリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴うプリオン株の出現、に関する研究を進め、その成果をもって非定型BSEを含め、動物プリオン病の病原体がヒトへ感染するリスクの低減に貢献する。

### B. 研究方法

1) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

1-1) ヒツジスクレイピーを高感度・高精度に検出するReal-Time Quaking Induced Conversion(RT-QuIC)の構築

PrP<sup>Sc</sup>のシードとして基質としてスクレイピーマウス順化株であるプリオン22L株、組換えマウス(Mo)PrP(rMoPrP)を使用した。

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。

10%マウス脳乳剤とrMoPrPを結合したNi<sup>2+</sup>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。

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。

1-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

サルに順化したプリオンの性状を解析するin vitroの実験系を構築することを目的として、カニクイザルPrnpを安定的に発現するヒト神経芽細胞IMR32細胞において、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。

## 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

### 2-1) L-BSE プリオン経口感染ウシの末梢組織における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積評価

L-BSE 感染ウシ脳乳剤 (50g) を経口投与 153 ヶ月を経たウシ (#9383) 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) 法を用いて中枢神経系における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を評価する。

### 2-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

< L-BSE 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 >

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連続 PMCA を行った。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。

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、上記の方法により決定した反応条件で連続 PMCA を行った。

< L-BSE および H-BSE 脳内および経口接種カニクイザルの解析 >

H-BSE 感染ウシの 10% 脳乳剤 (0.2 mL : 20 g 脳重量相当) をカニクイザル 2 頭 (#24 [2020 年 8 月 17 日安楽死 (1757 日目 : 4 年 10 か月)、#25 [2021 年 2 月 19 日安楽死 (1942 日目 : 5 年 4 か月)]) に脳内接種、また 20% 脳乳剤 (5.0 mL x 8 回 : 8 mg 脳重量相当) をカニクイザル 2 頭 (#26、#27 [2020 年 8 月 18 日安楽死 (1758 日目 : 4 年 10 か月)]) に経口投与を実施し、継続的に観察した。経口投与を行った #26 は 2021 年 11 月 15 日 (2212 日目 : 6 年 1 か月) に安楽死、解剖を行った。脳、脊髄、脊髄神経根、末梢神経、リ

ンパ節、眼球、鼻腔粘膜、骨髄、全身臓器を採取し、凍結およびホルマリン浸漬材料として保管した。経口的または脳内に H-BSE 由来プリオンを接種されたサルの中枢神経系を病理組織学および生化学的に詳細に解析した。

カニクイザルは定期的に、行動解析 (ビデオ撮影動画のスコアリング、摂食行動観察、神経・精神症状評価)、および機能解析 (運動機能評価 : アップルテスト ; 高次脳機能解析 : 食物回収試験)、皮質脳波測定を実施した。

L-BSE をカニクイザル脳内接種し 3 継代目の脳 20% 脳乳剤を 2 頭 (#30、#31) に 2021 年 1 月 27 日から 2021 年 3 月 17 日に経口投与を行った。また、L-BSE (BSE JP/24 佐世保 : L-BSE) をカニクイザル脳内接種し 1 継代目の #15 の 10% 脳乳剤をカニクイザル 2 頭 (#34、#35) に 2021 年 11 月 16 日に脳内接種を行った。

### 3) CWD および非定型スクレイピーのヒトへの感染リスクの推定、およびプリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴うプリオン株の出現

#### 3-1) TgHu129MM マウスを用いた動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

国内、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 μL) をヒトプリオンタンパク質遺伝子過発現マウス (TgHu129MM) 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 日間観察した。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<sup>Sc</sup> の蓄積を調べた。

#### 3-2) L-BSE および CWD 接種ハムスターにおける選択的神経傷害の解析

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。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。GLUT1、VGLUT2、VGAT、DAT、VMAT2、NMDAR1、

GLuR1、GLuR2、D1R および D2R 抗体を用いて IHC を実施して、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の傷害を解析した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### 1) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

##### 1-1) ヒツジスクレイピーを高感度・高精度に検出する RT-QuIC の構築

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、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。

マウス脳乳剤と rMoPrP 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。rMoPrP に結合した画分から Bu/Me により抽出される画分 (主に脂質を含む) に強い RT-QuIC 阻害活性が認められたことから、脳乳剤中に含まれる阻害物質は脂質であることが示唆された。

中枢神経系組織に存在するリン脂質の RT-QuIC 阻害活性を調べた結果、脳乳剤中に含まれるリン脂質のうち sphingomyelin (SP) が、RT-QuIC の阻害因子となることが明らかとなった。また、SP のコリンを切断する sphingomyelinase で SP を処理すると、RT-QuIC 反応が復活した。

##### 1-2) カニクイザル馴化プリオンが増殖する細胞の開発

カニクイザルの Prnp を安定発現する IMR32 に C-BSE 感染カニクイザルの脳ホモジネートを接種した後、連続継代しても、PrP<sup>Sc</sup> は持続的に

検出された。IMR 細胞はヒト Prnp を発現するので、産生された PrP<sup>Sc</sup> がヒト PrP<sup>C</sup> 由来かカニクイザル PrP<sup>C</sup> 由来かという点を、3F4 抗体 (サル PrP とヒト PrP に反応) と 1E4 抗体 (ヒト PrP への反応性が強い) を用いた WB により調べた。その結果、IMR32 細胞で産生された PrP<sup>Sc</sup> は、主としてカニクイザル PrP<sup>C</sup> を基質として生じた PrP<sup>Sc</sup> であることが判明した。

カニクイザルの Prnp を安定発現する IMR32 細胞は、サル馴化 C-BSE プリオンの持続感染が成立することから、サル馴化プリオン株を解析する in vitro の実験系となると考えられる。

#### 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

##### 2-1) L-BSE プリオン経口感染ウシの末梢組織における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積評価

L-BSE 感染ウシ脳乳剤経口投与 153 ヶ月後のウシ中枢神経系における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を WB 法を用いて調べたが、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、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を調べたが、いずれの組織からも PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。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<sup>Sc</sup> は検出されなかった。昨年度、L-BSE プリオン経口感染ウシ (接種後 88 ヶ月) の末梢神経および可食部の筋肉から PMCA 法により PrP<sup>Sc</sup> が検出されたことから、WB よりも高感度に PrP<sup>Sc</sup> の検出が可能な PMCA 法により PrP<sup>Sc</sup> の存在を確認する必要がある。

##### 2-2) 非定型 BSE を実験接種したカニクイザルの病態解析

カニクイザル馴化 L-BSE プリオンを高感度に検出可能な PMCA を構築し、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。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。

H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザル (#025: 接種後 1942 日) の脳の各部位への PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の有無をウエ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<sup>Sc</sup> に由来する陽性シグナルは検出されなかった。なお、#025 の *Prnp* の PrP コード領域は、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。

これまでに、H-BSE を脳内接種 (2 頭) および経口投与 (2 頭) したカニクイザルは、経過観察中、自傷行為が頻繁に観察された個体はいたが、持続的な神経症状は認められなかった。また、接種後、4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死を行い病理検索に供しているが、中枢神経系組織の IHC では PrP<sup>Sc</sup> は全て陰性であった。

3) CWD および非定型スクレイピーのヒトへの感染リスクの推定、およびプリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴う株の出現

3-1) TgHu129MM マウスを用いた動物由来プリオンのヒトへの伝達リスクの推定

各種スクレイピー感染ヒツジ脳乳剤を TgHu129MM マウスに接種 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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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。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<sup>Sc</sup> は検出されなかった。

3-2) L-BSE および CWD 接種ハムスターにおける選択的神経傷害の解析

BSE、CWD 接種ハムスターにおける PrP<sup>Sc</sup> 沈着は、線条体、黒質に一致してみられたが、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。また、大脳皮質では PrP<sup>Sc</sup> 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も、大脳皮質で PrP<sup>Sc</sup> 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、プリオン株にかかわらず PrP<sup>Sc</sup> 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。

## D. 考察

1) 各種動物プリオン病の高精度検出・解析系の整備

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、rMoPrP に結合すること、さらにはブタノール/メタノールで抽出されることから、脂質であることが推定された。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。Hoover らは (J Virol, 2017)、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ていることから、脳内の脂質組成を考慮して、総リン脂質、phosphatidylcholine、phosphatidylethanolamine、phosphatidylserine、sphingomyelin の RT-QuIC 反応の阻害効果を調べたところ、sphingomyelin に強い阻害効果があることを見だし、sphingomyelin のコリン残基とセラミド間を切断する sphingomyelinase で消化すると、RT-QuIC 反応が復活することから、脳乳剤中の sphingomyelin 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できる RT-QuIC 法の、試料前処理法として活用できるかもしれない。

サル馴化 C-BSE プリオンが、サル PrP を安定

発現する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。今後非定型 BSE プリオンの増殖についても調べる予定である。IMR32 細胞はヒト PrP<sup>C</sup> を発現していることから、より精密な *in vitro* 解析系を構築するためには、内在性のヒト PRNP を欠失させておくことが望ましい。既に、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ていることから、今後、この PRNP 欠失 IMR32 細胞に、カニクイザル PrP<sup>C</sup> を発現する細胞の作出を進める予定である。

## 2) 非定型 BSE 感染ウシおよびカニクイザルの病態解析

これまでの L-BSE 感染ウシ脳乳剤 10g を経口投与したウシ (4 頭) と 50g を経口投与したウシ (2 頭) の中枢神経系における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を調べた結果、50g 投与の 1 頭のみから PrP<sup>Sc</sup> を検出できた (投与後 88 ヶ月で斃死した個体)。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<sup>Sc</sup> が検出されたことから (R2 年度の成果)、L-BSE 対策としても特定危険部位 (SRM) の除去は必要であると考えられた。

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 WB および IHC 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ていたプリオンは微量であると考えられた。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。

非接種サルの脾臓乳剤からも PrPres が増幅し、再現性も確認できているが、この脾臓は 22 歳齢個体に由来するものであるため、加齢に伴う変

化に起因する可能性は否定できない。

H-BSE プリオンの脳内接種を行った 2 頭および経口接種を行った 2 頭について接種後 4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死し、解剖を実施したが、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、霊長類を用いた感染実験でも、H-BSE プリオンのヒトへの伝達リスクは、C-BSE プリオンや L-BSE プリオンと比べ、低いことが示唆された。

## 3) CWD および非定型スクレイピーのヒトへの感染リスクの推定、およびプリオンの異種間伝達によりヒトへの感染リスクを伴う株の出現

BSE、CWD 接種ハムスターでは、PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 沈着部位を含めよく維持されていた。この結果から、ドーパミン、GABA 共に前シナプス側の傷害はほとんどないものと考えられた。

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。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<sup>Sc</sup> 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。今回検討したプリオン株のうち、L-BSE 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 の発現に変化がみられた。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、後シナプス側にも傷害が生じていることを示唆している。

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<sup>Sc</sup> 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 では PrP<sup>Sc</sup> 陽性反応が認められるが、WB では PK 抵抗性の PrP<sup>Sc</sup> が検出されない。

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<sup>Sc</sup> 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プ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

- 1) 中枢神経系組織乳剤中に含まれる RT-QuIC の阻害物質として、sphingomyelin が同定された。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ことから、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。
- 2) 自然発生すると考えら連携推進室る 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を防ぐ、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。
- 3) これまで、H-BSE プリオンの脳内接種を行った 2 頭および経口接種を行った 2 頭について接種後 4 年目 10 か月から 6 年 1 カ月目に安楽死し、解析を進めてきたが、伝達を示す証拠は得られなかったことから、霊長類を用いた感染実験でも、H-BSE プリオンのヒトへの伝達リスクは、C-BSE プリオンや L-BSE プリオンと比べ、低いことが示唆された。
- 4) カニクイザル Prnp を安定発現するヒト神経芽種 IMR32 細胞が、サル馴化 C-BSE プリオンの増殖を持続的に保持できることを見出した。サル感染したプリオンを解析する

新たな in vitro ツールとなることが期待される。

- 5) BSE および CWD 感染ハムスターの解析から、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傷害を受けにくい、グルタミン作動性ニューロンが傷害されるという、プリオン病の病態を論じる上での新規知見を得た。
- 6) 50g を経口投与したウシ (2 頭) の中枢神経系における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を調べた結果、投与後 88 ヶ月で斃死した個体の 1 頭のみで PrP<sup>Sc</sup> 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低いことが示された。
- 7) ヒトプリオンタンパク質遺伝子過発現マウス (TgHu129MM) を用いた感染実験から、従来型スクレイプ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。

## 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

3)一方、