

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

食品を介する BSE リスクの解明等に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

7. 牛海綿状脳症 (BSE) プリオンの生物学的性状と「種の壁」のメカニズム解明

分担研究者 横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者 舩甚賢太郎、岩丸祥史、今村守一、岡田洋之、毛利資郎
(動物衛生研究所・プリオン病研究センター)

研究要旨 牛プリオン蛋白質 (PrP) 過発現トランスジェニックマウス (TgBoPrP) を用いて、牛海綿状脳症 (BSE) の伝達試験を行った。非定型 BSE (本邦 8 例目)、若齢型 BSE (本邦 9 例目) の伝達試験を継続しているが、現在までのところ両症例の TgBoPrP への伝達性は認められていない。定型 BSE プリオンを野生型マウスおよび各種 PrP を発現するトランスジェニックマウスへ伝達し、プリオンの感受性、蓄積した異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の性状の解析を行った。初代から BSE プリオンが伝達可能な動物 (tga20,MHM2) では BSE と類似した糖鎖型の PrP^{Sc} が検出された。一方、マウスで 1 代継代した BSE を接種した TgHaNSE,MH2M の脳からは、蛋白質分解酵素処理後にヘテロな断片を示す PrP^{Sc} が検出された。

A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は単一株に起因すると考えられてきたが、我が国を含めた各国で非定型 BSE の発生が報告されており、BSE プリオンが複数の株に分かれる可能性も示唆されている。我が国の BSE 症例のうち BSE/8/Fukushima (非定型)、BSE/9/Fukuyama (若齢型) は固相酵素免疫測定法 (ELISA) の吸光度も低く、ウエスタンブロット (WB) でのプロテイナーゼ K (PK) 抵抗性プリオン蛋白質 (PrPres) の蓄積量も少なかった。プリオンの性状解析には、増幅が必要であったため、ウシ型 PrP 過発現マウス (TgBoPrP) を用いて両症例のプリオンの増幅を試みた。また、新たな非定型症例 (BSE/24) について、野生型マウス、TgBoPrP およびウシへの伝達試験を行い、その性状解析を試みる。本課題は、非定型 BSE のリスク評価を行うための基礎的な知見を提供する。

BSE プリオンはヒトも含めて、マウス、ヒツジ、サルなど広範な動物種への伝達性が認められているが、ハムスターへの伝達性は示されていない。そこで、マウスおよびハムスターのキメラプリオン蛋白質

(PrP) を発現するトランスジェニックマウス (MHM2,MH2M) を用いて BSE プリオンの「種の壁」を規定するメカニズムについて検討する。BSE のヒトへのリスクを考えるためにも、種の壁のメカニズム解明が必要である。

B. 研究方法

1) わが国の BSE 各症例について TgBoPrP マウスへ脳内接種を行い、伝達性の有無を確認する。死亡マウスについては、WB および免疫組織化学 (IHC) により異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の有無を検討する。

Table 1. Summary of unusual and suspended BSE cases in Japan

case	age of cattle	ELISA ¹	WB	IHC	Spongiform changes	Remarks
BSE/8/Fukushima ²	23 months	0.23 ± 0.05	+	-	-	atypical BSE
BSE/9/Fukuyama ²	23 months	0.28 ± 0.03	+	-	-	young BSE
Suspended/Kanagawa ³	20 years	0.38 ± 0.09	±	-	-	
BSE/6/Wakayama	83 months	3.32 ± 0.2	+	+	+	typical

1, optical density (O.D.) value of TeSeE (Plateria BSE kit, Bio-Rad)
2, Yamakawa et al., 2003
3, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/03/h0327-2.html> (in Japanese)
4, Iwata et al., 2006

2) BSE 脳乳剤、野生型マウス初代および 2 代継代 BSE プリオンをマウスおよびハムスターのキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウス (MHM2, MH2M) に接種し潜伏期の差異およびマウス脳内に蓄積する PrP^{Sc} の性状について解析する。また、TgBoPrP で継代した BSE プリオンについても同様の解析を行い、「種の壁」のメカニズム解明を試みる。

C. 研究結果

1) TgBoPrP を用いた BSE/8/Fukushima, BSE/9/Fukuyama の伝達試験は、現在 2 代目の伝達試験を実施中である。同マウスを用いた定型 BSE プリオンの希釈試験では、英国の BSE 脳試料の感染価は $10^{6.7} ID_{50}/g$ であった。また、10%脳乳剤を 20 μ l 脳内接種する際の定型 BSE プリオンの検出限界は、 $10^{2.7} ID_{50}/g$ であった。

Table 1. Transmission of BSE to TgBoPrP

Inoculum	No. diseased ¹ / no. inoculated	mean \pm SE or sacrificed days
Titration assay of typical BSE		
0/1	6/6	217.8 \pm 3.8)
-1	6/6	257 \pm 2.6
-2	6/6	309 \pm 53.4
-3	6/6	386 \pm 13.9
-4	3/6	479 \pm 131.0
-5	0/6	>495
Transmission study of Japanese BSE cases		
BSE/8/Fukushima ²		
Primary passage	0/5	(600, 786, 788, 788, 860)
2nd passage	0/7	>550
BSE/9/Fukuyama ³		
Primary passage	0/6	(505, 577, 704, 881, 927, 927)
2nd passage	0/7	>495
Suspended/Kanagawa ⁴		
0/7	0/7	(717, 811, 831, 864, 864, 892, 927)
PBS		
0/5	0/5	(432, 475, 534, 609, 717)
BSE/6/Wakayama ⁵		
5/5	5/5	277.2 \pm 12.2

All mice were tested for PrP^{Sc} accumulation in the brain by western blotting, and mice that were positive were considered to be diseased

1, BSE sample obtained from the UK. Infectivity titer per gram was $10^{6.7}$

2, case of atypical BSE in a 23-month-old Holstein steer

3, case of BSE in a 21-month-old Holstein steer

4, BSE diagnosis suspended in a 20-year-old Japanese black cow. The faint unusual PK resistant PrP band was observed by using WB, but no spongiform change or no PrP deposition were detected in pathology.

5, case of typical BSE in a 83-month-old Holstein cow

BSE/24/Sasebo の材料については、マウス、トランスジェニックマウス、ウシへの脳内接種を行っており、経過観察中である。

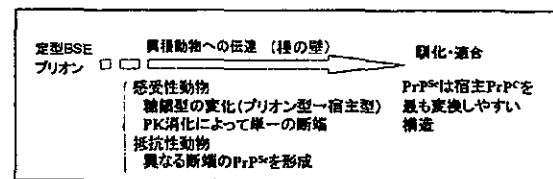
2) マウスおよびハムスターのキメラ PrP を発現する MH2M, MHM2 での伝達試験の結果、tga20, MHM2, ICR マウスは初代の BSE プリオンに感受性を示し (感受性動物と区分)、MH2M, TgHaNSE マウスは抵抗性を示した (抵抗性動物と区分)。このことから、BSE プリオンの初代での伝達性は PrP131-188 に含ま

れる I139L, Y155N, S170N のアミノ酸置換の関与が示唆された。野生型マウスで 1 代継代すると BSE プリオンは抵抗性動物にも伝達が認められた。この抵抗性動物に蓄積する PrP^{Sc} の性状解明が、種の壁のメカニズムを明らかにする上で重要と考えられる。蛋白質分解酵素処理した PrP^{Sc} (PrP_{core}) の糖鎖型および分子量を WB により比較した。すべてのマウスに蓄積した PrP_{core} は N 末側を認識する抗体 (B103) では BSE 型を示したが、C 末側を認識する抗体 (44B1) との反応では、抵抗性動物の PrP_{core} には BSE 型とは異なる糖鎖型、分子量の断片が検出された。感受性動物には均一な PrP^{Sc} が蓄積しているが、抵抗性動物ではヘテロな PrP^{Sc} が混在していると考えられた。

D. 考察

我が国での 8, 9 例目の BSE の牛型 PrP 発現マウス (TgBoPrP) での伝達試験では 2 代目までの継代を行っているが、伝達性は確認されていない。5%脳乳剤を用いた場合の TgBoPrP マウスの検出限界は $10^3 ID_{50}/g$ であり、これ以下のプリオンの存在は否定できない。

BSE プリオンを異種動物へ伝達するときの馴化の過程で、感受性動物 (初代から伝達が可能な動物種) では、馴化にともなって糖鎖型がプリオン株の特徴から宿主の特徴を含めたものへと漸次変化していくが、BSE プリオンの PrP_{core} の N 末端は均一であると考えられた。一方、抵抗性動物では PK 消化で異なる断端を示す PrP^{Sc} が検出され、抵抗性動物の脳内にはヘテロな PrP^{Sc} が混在していることが示唆された。



種の壁のモデル

E. 結論

TgBoPrP を使った脳内接種試験での定型 BSE プリオンの検出感度は $10^{2.7} ID_{50}/g$ であることが示された。非定型 BSE の伝達性は、現在まで認められていない。異種動物へのプリオンの伝達に際しては、PK 処理により異なる断端

を形成するヘテロな PrP^{Sc}が蓄積していることが示された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murayama Y, Yoshioka M, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Sudo T, Sato K, Shinagawa M, Mohri S: Protein misfolding cyclic amplification as a rapid test for assessment of prion inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 348: 758-762, 2006.
- 2) Yokoyama T, Shimada K, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, Kimura KM, Itohara S, Shinagawa M: Both host prion protein 131-188 subregion and prion strain characteristics regulate glycoform of PrP^{Sc}. *Arch Virol*, 152: 603-609, 2007
- 3) Yoshioka M., Miwa T., Horii H., Takata M., Yokoyama T., Nishizawa K., Watanabe M., Shinagawa M., Murayama Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a Bacillus strain that effectively degrades prion protein. *J Appl Microbiol* 136: 9-17, 2007.
- 4) Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Shinagawa M, Kitani H: Immortalized cell lines from cryopreserved fetal bovine brain tissues. *Cell Biol Int* 31: 57-64, 2007.
- 5) Iwamaru Y, Takenouchi T, Ogihara K., Hoshino M, Takata M, Imamura M, Tagawa Y, Hayashi-K H, Ushiki-K Y, Shimizu Y, Okada H, Shinagawa M, Kitani H, Yokoyama T: Microglial cell line established from prion protein overexpressing mice is susceptible to various murine prion strains. *J Virol* 81: 1524-1527, 2007.
- 6) Miyamoto K, Shimamoto T, Aosasa M, Kimura S, Nakamura N, Okubo Y, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H: Development of recombinant chicken IgY from single chain fragment of variable region for diagnosis of BSE. *Biologicals*. (in press)

2. 学会発表

- 1) Yokoyama T, et al.: Alteration in the biological characteristics of BSE prion monitored by their incubation period in transgenic mice. *NeuroPrion*, October 2006, Italy.
- 2) Yokoyama T: Biological characteristics and species barrier of BSE prion. BSE seminar – towards the control of prion diseases –, October 2006, Tokyo.

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