

内閣府食品安全委員会 プリオン専門調査会(第68回) 説明資料

# BSEプリオンの感染実験とその解析

1. ウシへの経口感染実験
2. マウスを用いたバイオアッセイ
3. 非定型BSEの確認

平成24年2月27日

(独)農業・食品産業技術総合研究機構  
動物衛生研究所 プリオン病研究センター

毛利 資郎

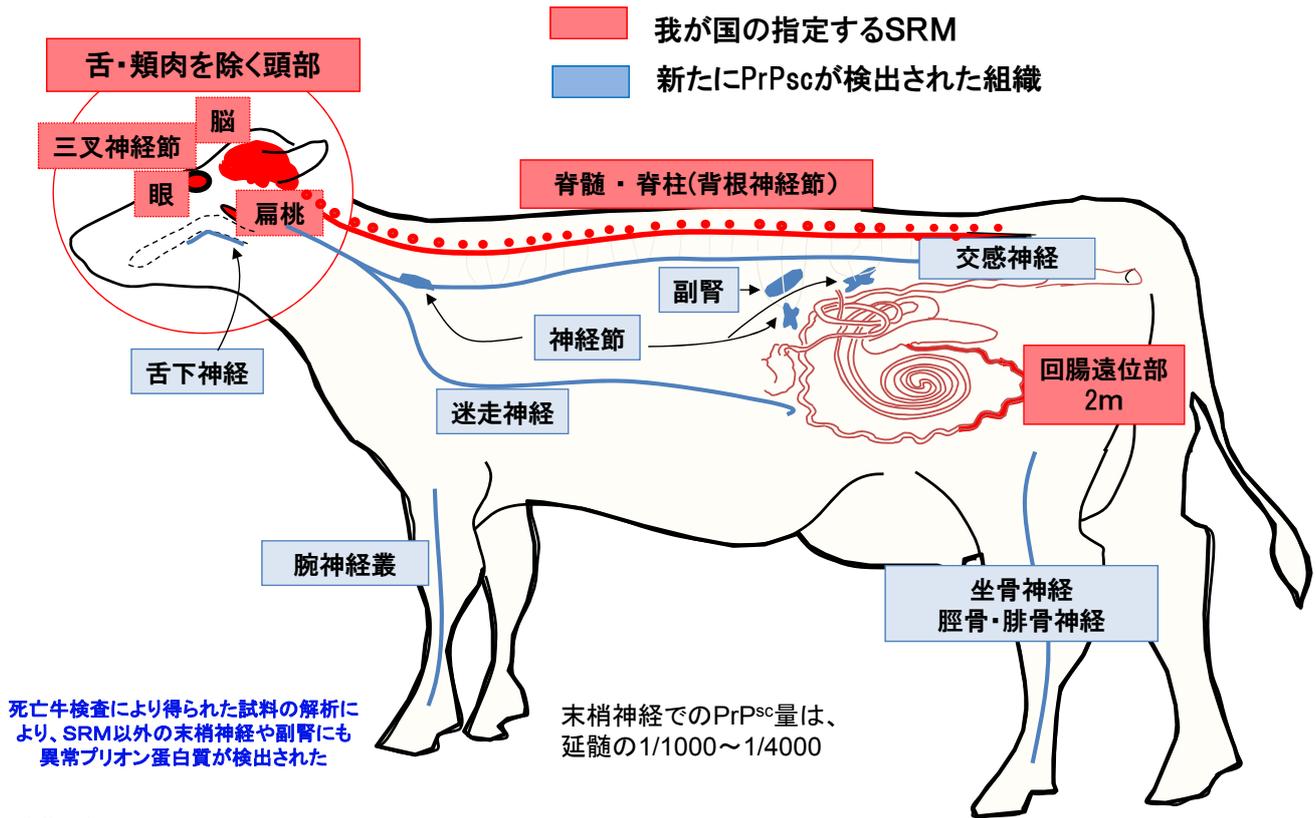
1

## 1. ウシへの経口感染実験

経口投与量と蓄積時期

2

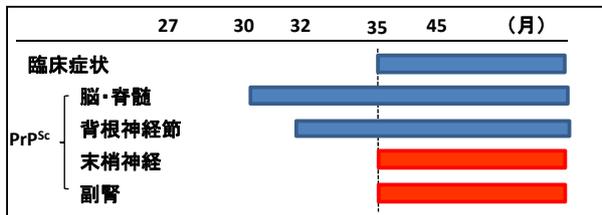
## わが国11例目のプリオンの分布（死亡牛検査 日本 NIAH）



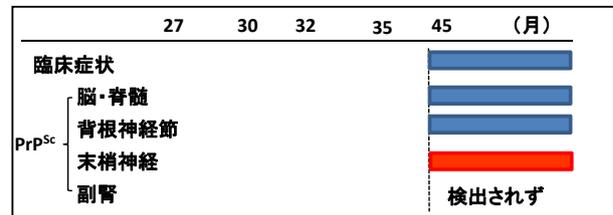
## BSE実験感染牛の経時的解析（英国経口接種材料）日本 NIAH

BSE感染牛の解析により、臨床症状期の感染牛では、BSEプリオンの蓄積が特定危険部位（SRM）に限局していないことが明らかとなった。BSE実験感染牛の試料を用いて、末梢神経、副腎に検出されるBSEプリオンの出現時期を明らかにした。

100g投与群



1g投与群



### 【考察】

- BSE感染牛の体内のプリオン分布はSRM以外の末梢神経や副腎にも蓄積
- しかし、SRM以外の組織におけるBSEプリオンの蓄積は中枢神経系におけるPrP<sup>Sc</sup>検出時期と同時かそれ以降（末梢神経へは、中枢神経系から下降性に伝播したと推測される）

### 【今後の課題】

- プリオンの感染経路…消化管から中枢神経系への（上行性）経路の解明

**BSEプリオン感染実験 (Arnoldら 2007年) 英国 VLA**  
 ~BSE実験感染牛におけるPrP<sup>Sc</sup>検出及び潜伏期間の経時的関係~

**【目的】**

潜伏期間中における末梢神経系部分の検出時期及び順番を明らかにする。

**【方法】**

BSE感染牛の脳幹100gまたは1gを牛(4-6ヶ月齢)へ経口投与して逐次と殺

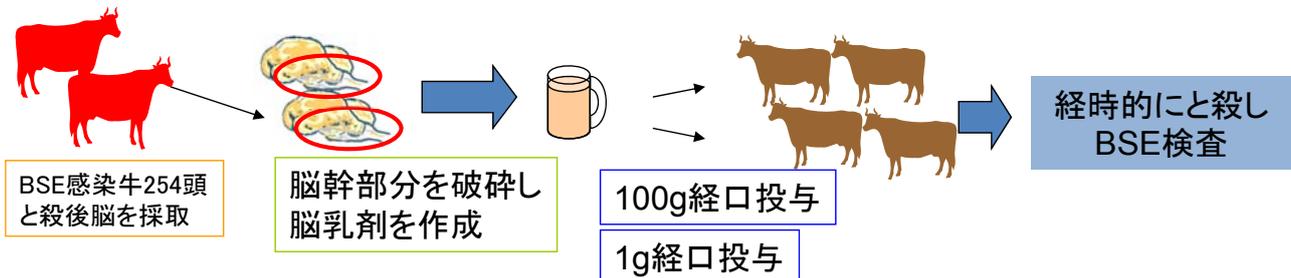
実験1 牛30頭に、感染性のある牛脳幹100gを経口投与

実験2-1 牛100頭に、感染性のある牛脳幹100gを経口投与

2-2 牛100頭に、感染性のある牛脳幹1gを経口投与



IHC、WB、ELISA により中枢神経系・特定の末梢神経系神経節を検査

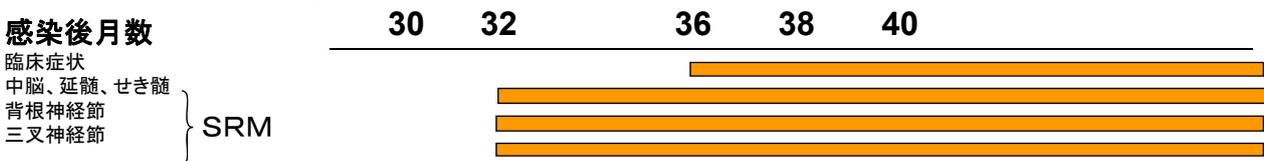


出典: M. E. Arnold et al. 2007. Journal of General Virology(88)3198-3208.  
 Estimating the temporal relationship between PrP<sup>Sc</sup> detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle

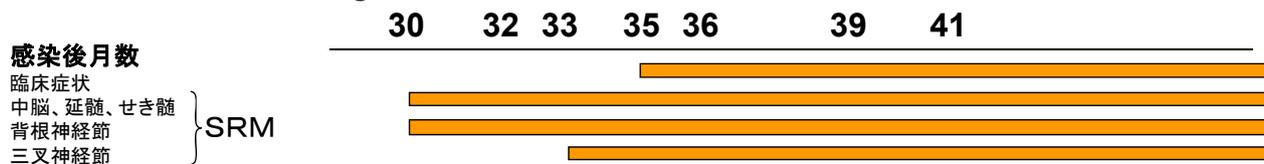
**BSEプリオン感染実験 (Arnoldら 2007年) 英国 VLA**  
 ~BSE実験感染牛におけるPrP<sup>Sc</sup>検出及び潜伏期間の経時的関係~

BSE感染牛脳幹100gまたは1gを牛に経口投与し、BSEを発症した潜伏期間(月)及び各組織でのBSEプリオンの検出時期を求めた。

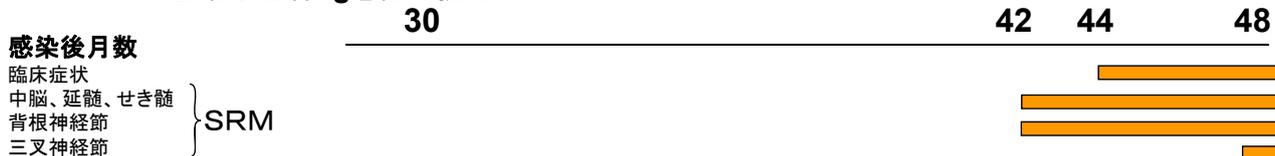
**1. BSE感染牛脳幹100gを経口投与**



**2-1. BSE感染牛脳幹100gを経口投与**



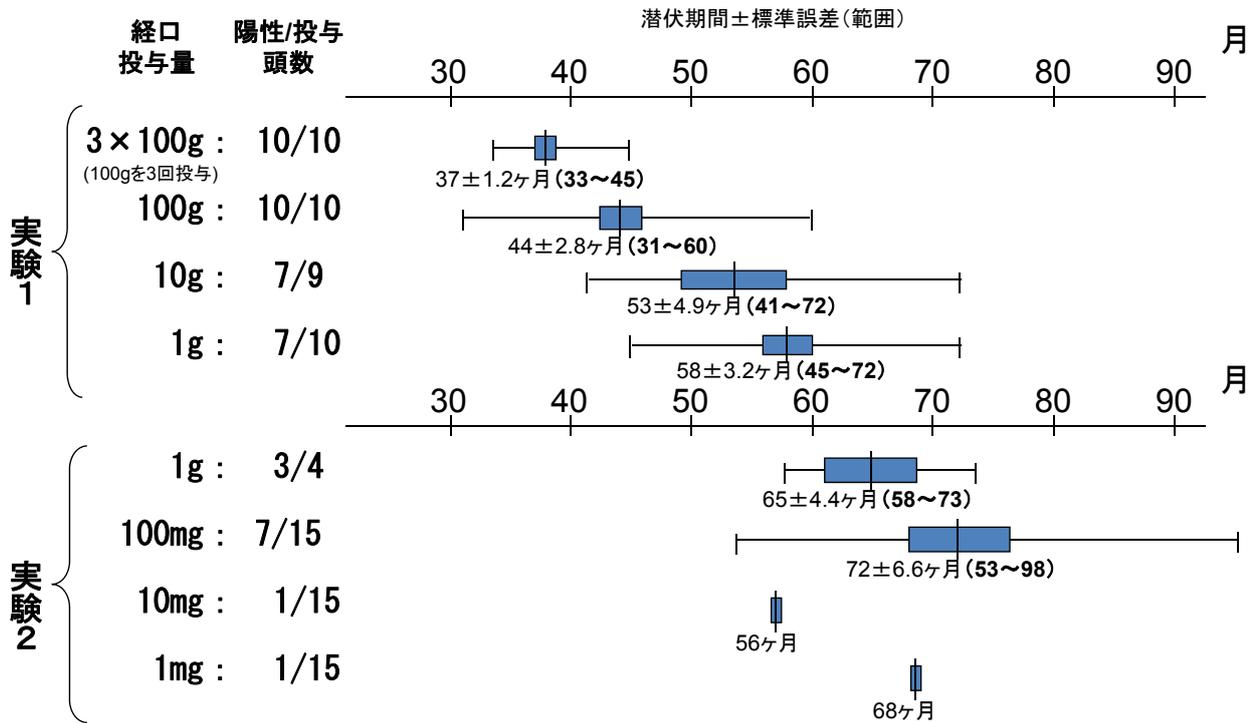
**2-2. BSE感染牛脳幹1gを経口投与**



出典: M. E. Arnold et al. 2007. Journal of General Virology(88)3198-3208.  
 Estimating the temporal relationship between PrP<sup>Sc</sup> detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle

## BSEプリオン感染実験(Wellsら 2007年)英国 VLA ～暴露量とウシの平均潜伏期間に関する知見～

1mg～100gのBSE感染牛の脳幹を牛(4-6ヶ月齢)に経口投与し、発症・安楽死までの潜伏期間(月)から、各投与量ごとの平均発症期間を算出した。(実験1と2は同一投与方法で投与量を変更している。)



出典: G. A. H. Wells et al. 2007, Journal of General Virology (88) 1363-1373

7

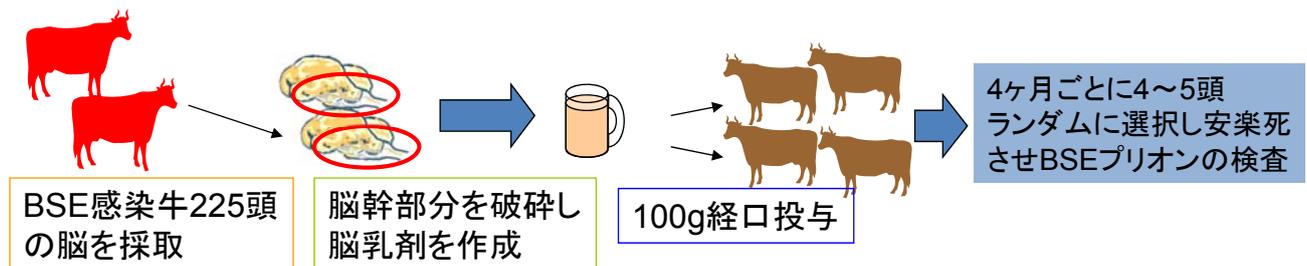
## BSEプリオン感染実験(Hoffmannら 2007年)ドイツ FLI ～腸から中枢神経系へのプリオン伝達経路の仮説～

### 【目的】

- ・中枢神経系においてBSEプリオンが検出される最も早い時期を明らかにする
- ・BSEプリオンが牛の消化管から中枢神経系に至る経路を解明する

### 【方法】

シンメンタール交雑種仔牛56頭(4ヵ月齢)にBSE陽性牛225例の脳幹破碎液を経口投与



8

## BSEプリオン感染実験(Hoffmannら 2007年)ドイツ FLI ～腸から中枢神経系へのプリオン伝達経路の仮説～

BSE感染牛の脳幹100gを牛に経口投与し、逐次と殺後解剖し各組織からのBSEプリオンの検出を試みた

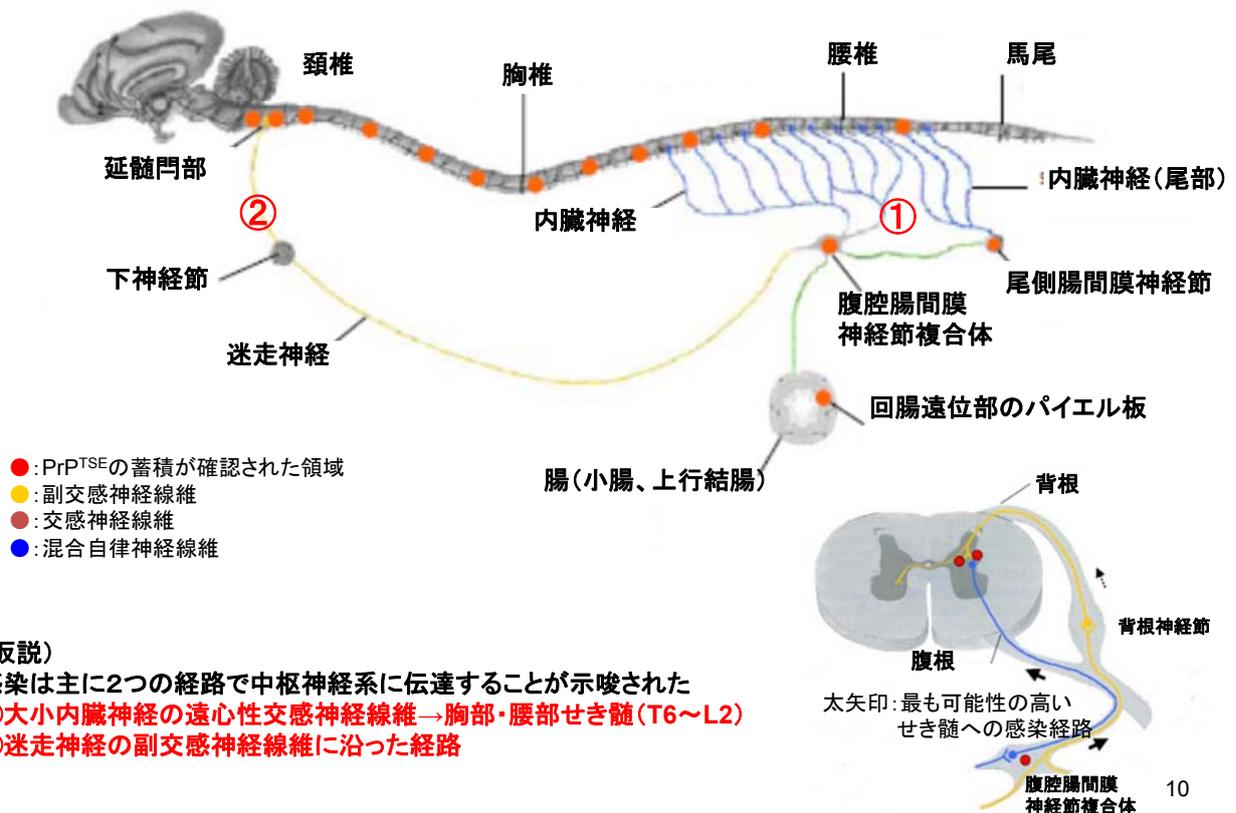
	部位	牛A (感染後24ヶ月)	牛B (感染後28ヶ月)
中枢神経系	延髄(門部)	+	+
	中脳	-	ND
	せき髄	+	-
	背根神経節	-	-
末梢神経系	腹腔神経節及び後腸間膜動脈神経節	+	-
	その他末梢神経	-	-
	回腸	+	-

※IHC(免疫組織化学)検査及びPTA-WB法を用いてBSE特異的PrP<sup>Sc</sup>の検出を行った  
 ※牛A、牛Bは、経口投与後最も早く 延髄門部においてPrP<sup>Sc</sup>が検出された2頭  
 ※ND: Not done

出典: C. Hoffmann et al. 2007, Journal of General Virology (88) 1048-1055 Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy

9

## BSEプリオン感染実験(Hoffmannら 2007年)ドイツ FLI ～腸から中枢神経系へのプリオン伝達経路の仮説～



10

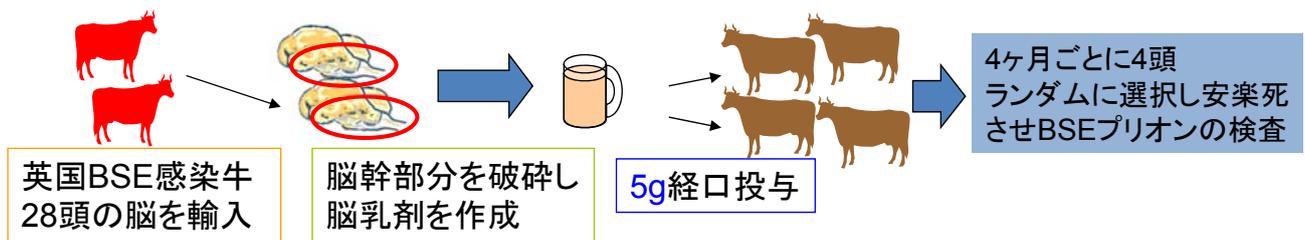
BSEプリオン感染実験 (Okadaら 2010年) 日本 NIAH  
 ~BSEの病態と異常プリオン蛋白質の蓄積時期~

【目的】

・BSE実験感染牛より経時的に採材された組織についてPrP<sup>Sc</sup>の蓄積の有無を調べる

【方法】

ホルスタイン種28頭(12カ月齢以下)に英国BSE陽性牛20例の脳幹破碎液を経口投与



11

C-BSEの牛経口投与試験成績(日本 NIAH)

牛番号	接種後月数	連続パ イエル板	扁桃	脳	脊髄	臨床 症状
1	18	-	-	-	-	-
2	20	+	-	-	-	-
3	20	-	-	-	-	-
4	20	+	-	-	-	-
5	20	+	-	-	-	-
6	24	-	-	-	-	-
7	24	-	-	-	-	-
8	24	-	-	-	-	-
9	24	-	-	-	-	-
10	30	-	-	-	-	-
11	30	-	-	-	-	-
12	30	-	-	-	-	-
13	30	+	-	-	-	-

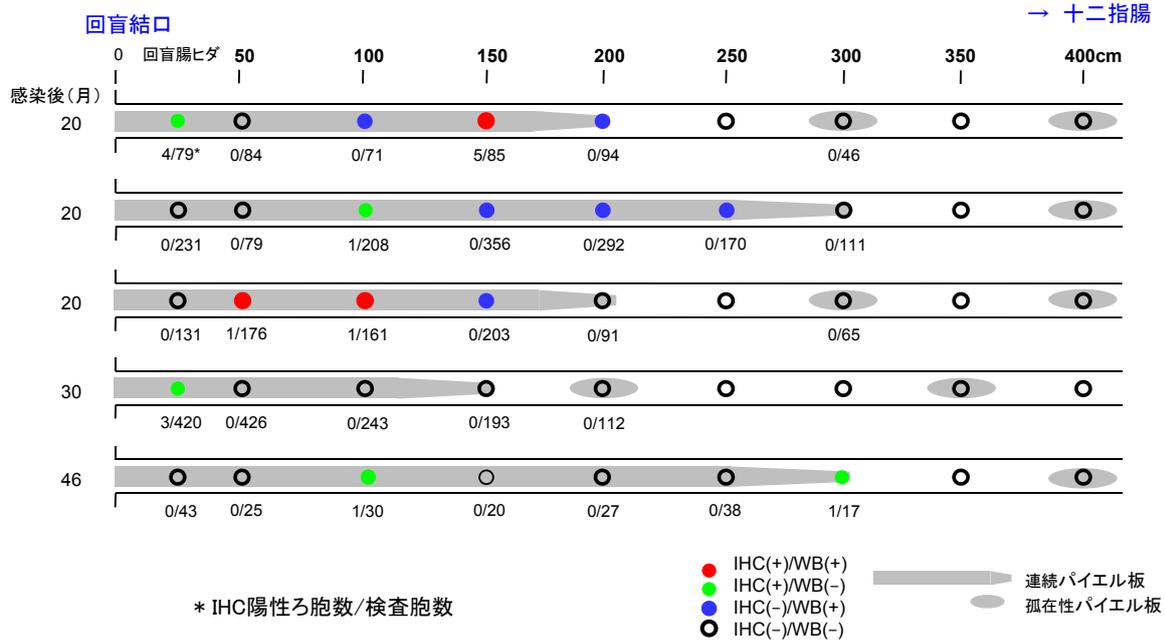
番号	接種後月数	連続パ イエル板	扁桃	脳	脊髄	臨床 症状
14	34	-	-	+	+	+
15	36	-	-	-	-	-
16	36	-	-	-	-	-
17	36	-	-	+	+	-
18	42	-	-	+	+	+
19	46	+	+	-	-	-
20	48	-	-	-	-	-
21	48	-	-	-	-	-
22	48	-	-	-	+	-
23	48	-	-	-	-	-
24	58	-	-	+	+	+
25	60	-	-	-	-	-
26	66	-	-	+	+	+
27	66	-	-	+	+	+
28	84	-	-	+	+	+

免疫組織染色によるPrP<sup>Dls</sup>の検出

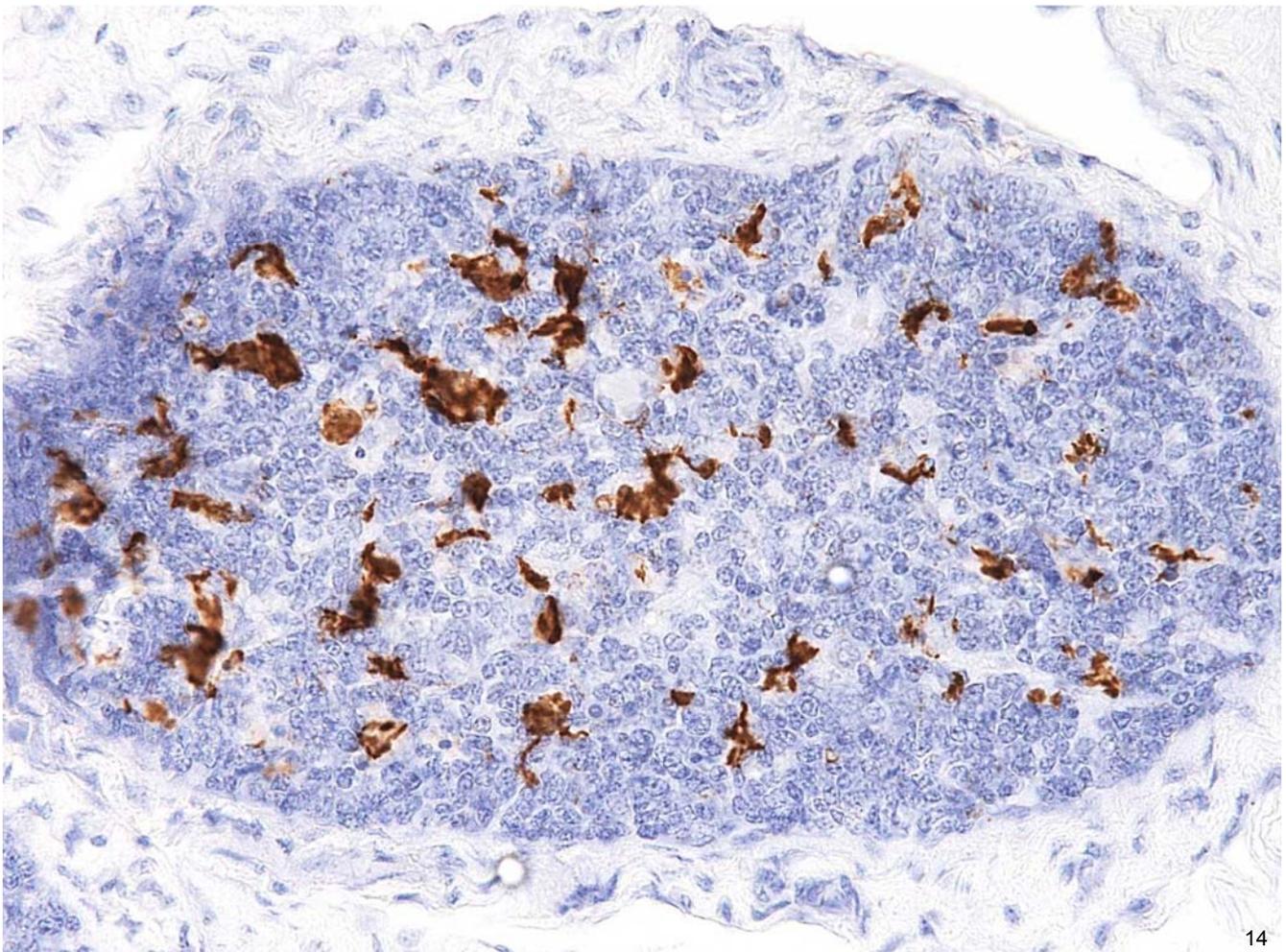
Okada H. et al., Transbound Emerg Dis. 2011 modified

12

# 経口感染後のウシの小腸における異常プリオン蛋白質の沈着



*Okada H et al. Transbound Emerg Dis. 2011 追加*



## BSE発生年別の幼若牛と老齢牛(英国)

1. BSEの発生牛は飼料規制の実施年以降に生まれた牛に目立って少なくなる\*

1. 発生最小年齢が低い場合は潜伏期間も短く、大量のBSEを接種したものと考えられる

2. BSEの発生は過去の感染例を見ていることを常に考慮すべき

\* 1990:  
SRMの飼料利用規制

\* 1996:  
全ての家畜へ、ほ乳動物由来肉骨粉の給与禁止

発生年	最小齢1 (月)	最小齢2 (月)	BSE牛出生頭数 (判明数)	発生頭数	最老齢2 (年.月)	最老齢1 (年.月)
1986	30	33	19,977		5.07	6.07
1987	30	31	37,478		10.00	11.00
1988	24	27	22,758	2,514	11.01	12.01
1989	21	24	12,880	7,228	12.00	13.00
1990	24	24	5,821	14,407	14.00	15.00
1991	24	26	4,833	25,359	17.05	18.05
1992	20	26	3,585	37,280	16.02	17.02
1993	29	30	3,039	35,090	18.10	19.10
1994	30	30	2,311	24,438	16.07	17.07
1995	24	32	1,248	14,562	15.05	16.05
1996	29	30	111	8,140	17.02	18.02
1997	37	37	58	4,393	15.01	16.01
1998	34	36	53	3,235	15.05	16.05
1999	39	41	35	2,301	13.10	14.10
2000	40	42	14	1,443	19.09	20.09
2001	45	48	7	1,202	20.08	21.08
2002	47	48	8	1,144	22.07	23.07
2003	46	49	5	611	20.06	21.06
2004	49	52	2	343	22.07	23.07
2005	36	38	0	225	19.04	20.04
2006	48	58	0	114	19.09	20.09
2007	62	66	0	67	19.00	20.00
2008	65	69	0	37	20.07	21.07
2009	72	86	0	12	18.03	19.03
2010	64	72	0	11	17.00	18.00
2011	135	143	0	5	12.07	13.07

[http://vla.defra.gov.uk/science/docs/sci\\_tse\\_stats\\_age.pdf](http://vla.defra.gov.uk/science/docs/sci_tse_stats_age.pdf)

15

## BSE発生年別の幼若牛と老齢牛(日本)

1. BSEの発生は過去の感染例を見ていることを常に考慮すべき

2. 1995-1996年生まれのクワスターは5年後から60ヶ月以上の年齢の牛でBSEを検出

3. 1999-2002年生まれのクワスターは5年後から50ヶ月以上の年齢の牛でBSEを検出

発生年	最小齢1 (月)	最小齢2 (月)	BSE牛出生頭数	発生頭数	最老齢1 (月)	最老齢2 (月)
1992			2	0		
1993			0	0		
1994			0	0		
1995			1	0		
1996			12	0		
1997			0	0		
1998			0	0		
1999			4	0		
2000			13	0		
2001	64+	67	3	3	68	
2002	73+	80+	1	2		
2003	21	23	0	4	83+	81
2004	48*	62	0	5	103+	95+
2005	54+	57	0	7	109	108
2006	64*	64*	0	10	169+	84+
2007	65*	84*	0	3	185	
2008	89*		0	1		
2009	101+		0	1		
2010	0		0	0		
2011	0		0	0		

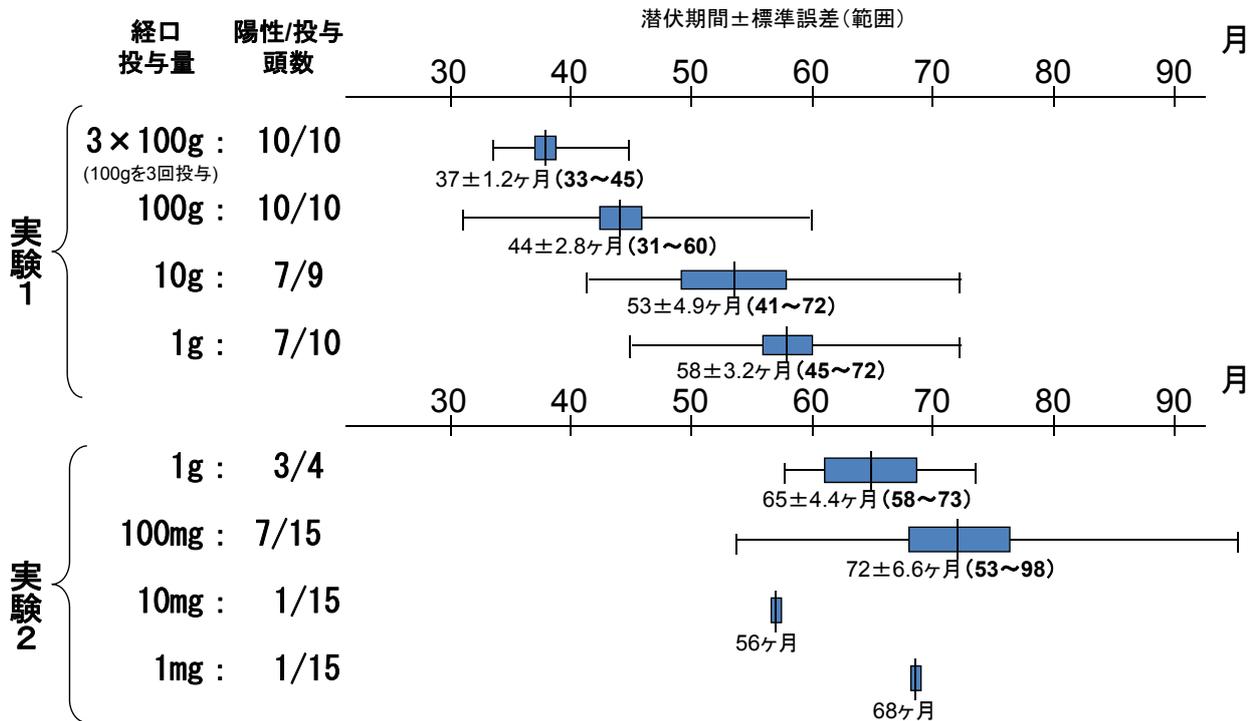
+ : 臨床的にBSEの可能性

\* : 何らかの症状 (BSEは除外?)

16

## BSEプリオン感染実験(Wellsら 2007年)英国 VLA ～暴露量とウシの平均潜伏期間に関する知見～

1mg～100gのBSE感染牛の脳幹を牛(4-6ヶ月齢)に経口投与し、発症・安楽死までの潜伏期間(月)から、各投与量ごとの平均発症期間を算出した。(実験1と2は同一投与方法で投与量を変更している。)



出典: G. A. H. Wells et al. 2007, Journal of General Virology (88) 1363-1373

17

## 2. マウスを用いたバイオアッセイ

1. マウスの系統により感受性(=感度)が異なる。
2. 潜伏期間の短いマウスが必ずしもプリオンに対する感受性が高いとは限らない。
3. ウシ型マウスはウシよりも感受性(=感度)が高い？
4. BSE感染脳乳剤は牛個体、採材部位により、感染価が異なる。

18

## 終末希釈によるウシ乳剤(BSE6)の遺伝子改変マウスへの感染実験

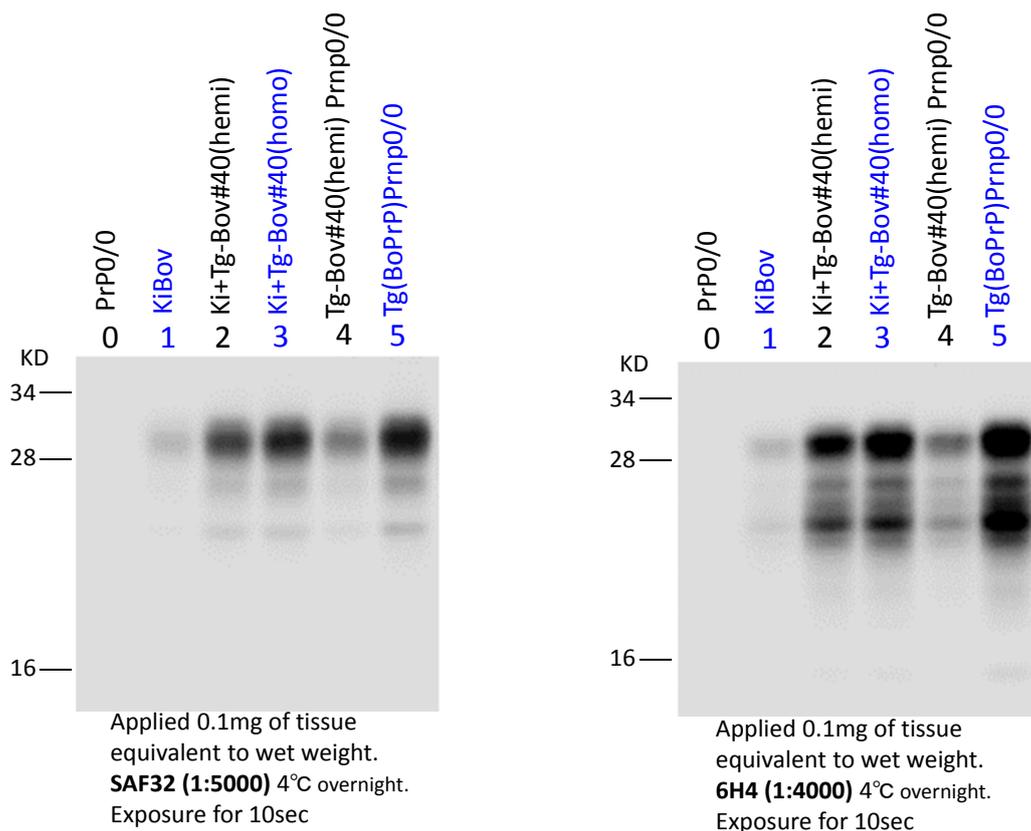
log <sub>10</sub> dilution of BSE6	潜伏期間(mean days ± SD, affected/inoculated)		
	KiBov	Ki+Tg-Bov#40	Tg(BoPrP)Prnp <sup>0/0+</sup>
-1	611 ± 113 (5/5)	287 ± 30 (11/11)	218 ± 4 (6/6)
-2	681 ± 58 (4/5)	333 ± 51 (11/11)	257 ± 3 (6/6)
-3	617 ± 168 (2/5)	361 ± 47 (10/10)	309 ± 53 (6/6)
-4	733 ± 2 (3/5)	473 ± 71 (10/12)	389 ± 14 (6/6)
-5	NT	604 (1/11)	479 ± 131 (3/6)
-6	NT	620 ± 23 (2/11)	>495 (0/6)

† The data was cited from Yokoyama et al., (2007) Jpn. J. Infect. Dis. 60: 317-320

- ・ BSE感染牛脳の希釈に伴い、Ki+Tg-Bo#40 マウスの潜伏期間は延長する。
- ・ Ki+Tg-Bov#40マウスは既報の遺伝子過剰発現マウス(Tg(BoPrP)Prnp0/0)と同等の感度を有する。

19

## ウシプリオン蛋白質遺伝子導入マウスの正常プリオン(PrP<sup>C</sup>)発現量の比較



20

## BSE感染牛脳乳剤の感染性の比較 (ウシ、ウシ型プリオン遺伝子導入マウス、野生型マウス)

C-BSE <PG31/90>	Species transmitted		
	Cattle	Tg(BoPrP)Prnp <sup>0/0</sup>	Wild
<b>log LD50/g</b>	<b>6.0†</b>	<b>6.9</b>	<b>3.1</b>

The data were cited from Safar J.G. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20: 1147-1150  
 † Wells et al. (1987) Vet Rec 142: 103-106

C-BSE <BBP12/92>	Species transmitted		
	Cattle	TgbovXV	Wild
<b>log LD50/g</b>	<b>6.0‡</b>	<b>7.7</b>	<b>3.3</b>

The data were cited from Buschmann A., Groschup M.H. (2005) J. Infect. Dis. 192: 934-942  
 ‡ Hawkins et al., (2000) Proceedings of the Cambridge Healthtech Institute's Second International Transmissible Spongiform Encephalopathy Conference (Alexandria, VA). 2000

ウシ型遺伝子過剰発現系マウスのバイオアッセイは牛に感染させるよりもBSEの感染性を高感度に検出可能。

21

**Table 4. End-point titration assay of BSE cattle brains in Ki+Tg-Bov#40(homo) mice**

log <sub>10</sub> dilution	incubation period (mean days ± SD, affected/inoculated)				
	C-BSE				L-BSE
	BSE3	BSE6	BSE7	BSE8	BSE9
<b>-1</b>	<b>279 ± 34</b> (13/13)	<b>287 ± 30</b> (11/11)	<b>323 ± 32</b> (5/5)	<b>294 ± 35</b> (8/8)	<b>283 ± 4</b> (7/7)
<b>-2</b>	<b>298 ± 28</b> (5/5)	<b>333 ± 51</b> (11/11)	<b>326 ± 30</b> (6/6)	<b>298 ± 21</b> (5/5)	<b>307 ± 23</b> (6/6)
<b>-3</b>	<b>377 ± 54</b> (5/5)	<b>361 ± 47</b> (10/10)	<b>384 ± 17</b> (5/5)	<b>361 ± 21</b> (5/5)	<b>336 ± 39</b> (5/5)
<b>-4</b>	<b>417 ± 60</b> (5/5)	<b>473 ± 71</b> (10/12)	<b>424 ± 66</b> (5/6)	<b>374 ± 36</b> (6/6)	<b>500 ± 119</b> (5/5)
<b>-5</b>	<b>488 ± 94</b> (2/5)	<b>604</b> (1/11)	<b>&gt;650</b> (0/6)	<b>527 ± 80</b> (4/5)	<b>363</b> (1/4)
<b>-6</b>	<b>&gt;769</b> (0/6)	<b>620 ± 23</b> (2/11)	<b>&gt;650</b> (0/6)	<b>657</b> (1/5)	<b>&gt;818</b> (0/5)
<b>infectious dose (log LD50/g)</b>	<b>6.7</b>	<b>6.3</b>	<b>6.0</b>	<b>7.2</b>	<b>6.5</b>
<b>95%信頼区間</b>	<b>± 1.0</b>	<b>± 2.0</b>	<b>± 0.8</b>	<b>± 1.1</b>	<b>± 0.8</b>

• Ki+Tg-Bov#40 (homo)マウスのバイオアッセイでは、C-BSEとL-BSEの感染性を半定量的にチェック可能(NIAH プリオン病研究センター基礎データ)

22

### 3. 非定型BSEの確認

1. わが国を含めて非定型BSEが確認
2. 非定型BSEは非常にまれであるが、起源や由来が不明のために発生防御上の対策については、今後、さらなる科学的知見が必要

## 非定型BSEの確認

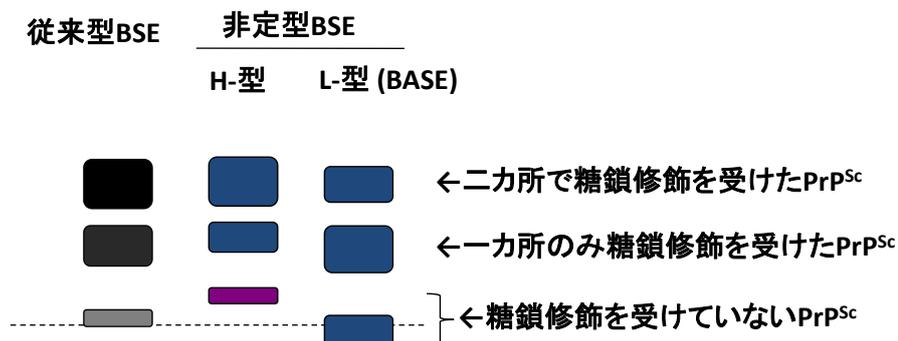
### 非定型 BSE

13カ国で確認(日本、イタリア、ドイツ、フランス、オランダ、米国、ベルギー、スウェーデン、デンマーク、ポーランド、スイス、カナダ、英国)、60例以上

ウエスタンブロットのパターンの異なる異常プリオン蛋白質が検出

少なくとも2種類(H-型、L-型 = BASE)に分類される(非定型は単一ではない)

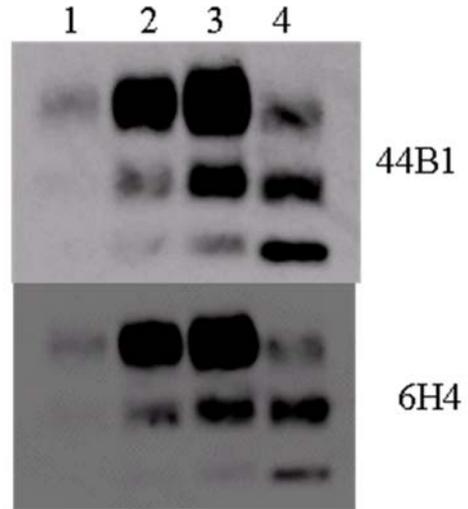
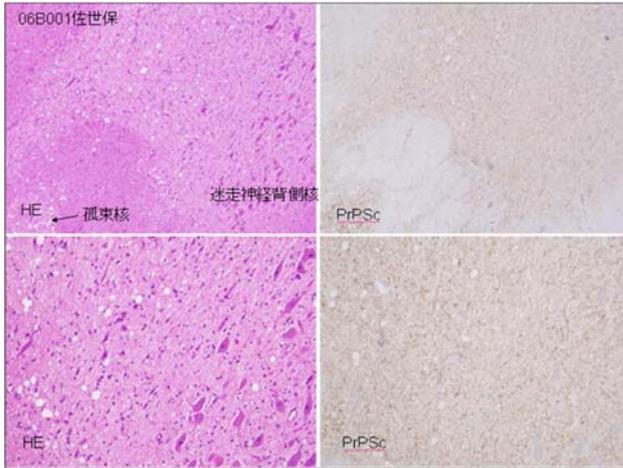
#### ウエスタンブロットのパターンによる非定型BSEの分類



# 非定型BSEと従来型とのglycoform 及び非糖鎖型の分子量の比較

1. 和歌山 (6例目)
2. 神奈川 (5例目)
3. 神奈川 (10例目)
4. 佐世保 (24例目)

病理組織診断



(感染研ホームページより)

25

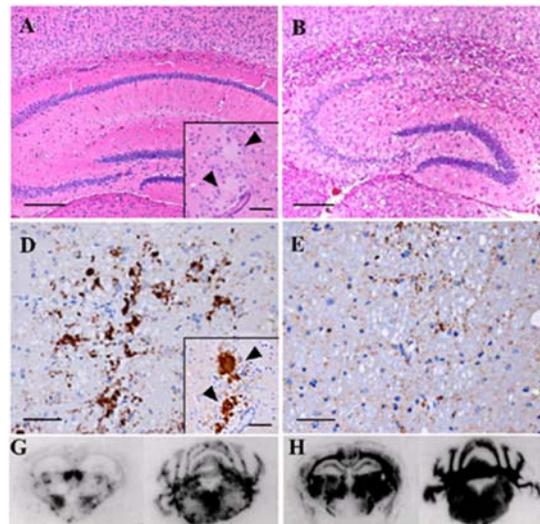
## 非定型BSEのウシ型遺伝子改変マウスへの感染試験

潜伏期間  
 従来型BSE 223.5日  
 非定型BSE 197.7日

非定型BSEでは従来型に比べて、強い空胞変性が認められる

従来型BSEではプリオン斑(D矢印)が認められるが、非定型BSEではび慢性のプリオンの沈着

脳内のプリオン沈着分布も異なる

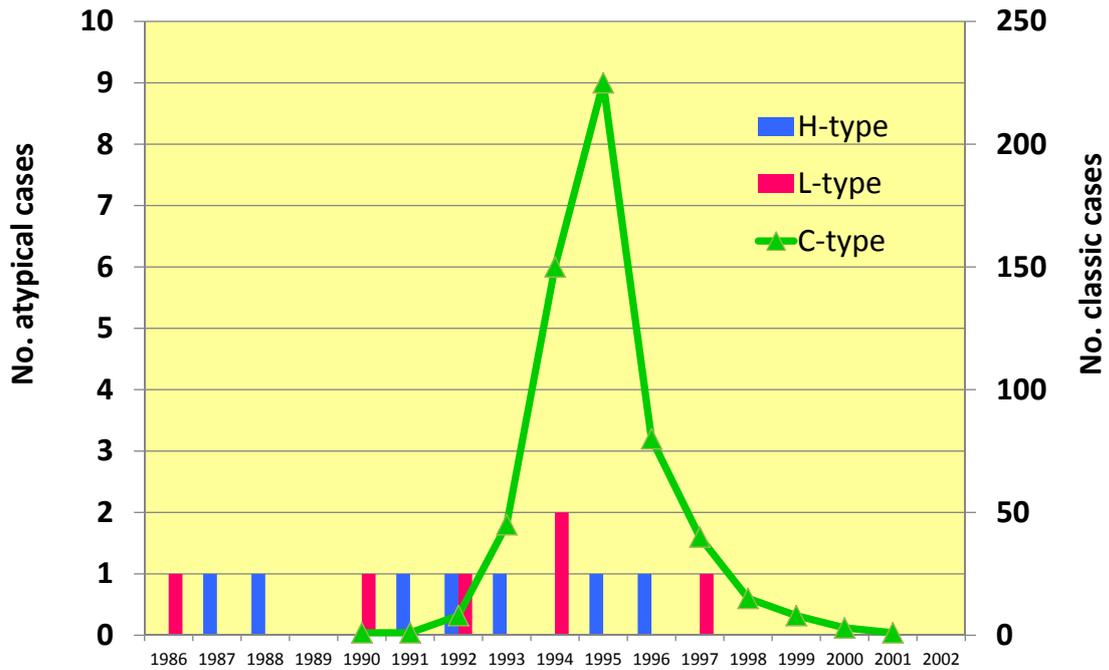


牛型遺伝子改変マウスへの感染試験で、従来BSE(左)と非定型BSE(右)のプリオンは異なる性状を示す

◇2006年にわが国で発見された非定型牛海綿状脳症(BSE) (国内24例目, 黒毛和牛, 14歳)は、感染性を示し、これまで発見されたBSEとは異なる感染宿主域と性状を示す:従来型BSEプリオンとは異なるプリオンである。

◇非定型BSEの起源の解明が必要である。

牛海綿状脳症 (BSE) 発生牛の誕生日 (フランス2001年7月～2007年6月)



H-type, higher molecular masses of unglycosylated proteaseresistant prion protein (PrPres);  
L-type, lower molecular masses of unglycosylated PrPres; C-type, classic BSE

Anne-Gaëlle Biacabe, Emerging Infectious Disease

• www.cdc.gov/eid • Vol.14, No.2, February

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
動物衛生研究所 プリオン病研究センター



(動物衛生研究所 動物衛生高度研究施設)

BSL3実験室、BSL3動物室を備えている。排気はHEPAフィルターで濾過、  
実験排水・動物排水・廃棄物はオートクレーブ処理(135°C30分)。2004年8  
月よりBSEの動物実験を開始。