

## 定型、非定型BSEのヒトへのリスクについて —ヒト型遺伝子組換えマウスやサルへの感染実験の報告から—

- BSEプリオンのヒトへのリスクや種の壁(バリア)のデータを得るためには、疫学調査のほか、動物実験が必要。
- 自然感染の実験としては経口感染によるものがのぞましい。
- ヒト型プリオン遺伝子組換えマウスには、ノックインないし過剰発現マウス等があり、脳内接種(IC)実験が行われている。
- 脳内接種(IC)実験は、伝達(感染)効率がよい、接種量が少ない、潜伏期間が短い、発症率が高いといった特徴がある。
- 脳内接種で伝達できないときは、経口感染による伝達の可能性は少ない。
- カニクイサルは、生理的にヒトとほぼ同じで、ヒトへのリスクを評価する実験動物として最適。エイズ、TSE、マラリア、インフルエンザなどの予防や治療のための薬剤やワクチンの研究開発に関する実験には必要と思われる(EU2002)。
- サルは、消化管の病態生理がヒトに類似、プリオン遺伝子が129MM、神経病理像がvCJDに類似している。

# 定型BSEをヒト型Tgマウスに脳内接種

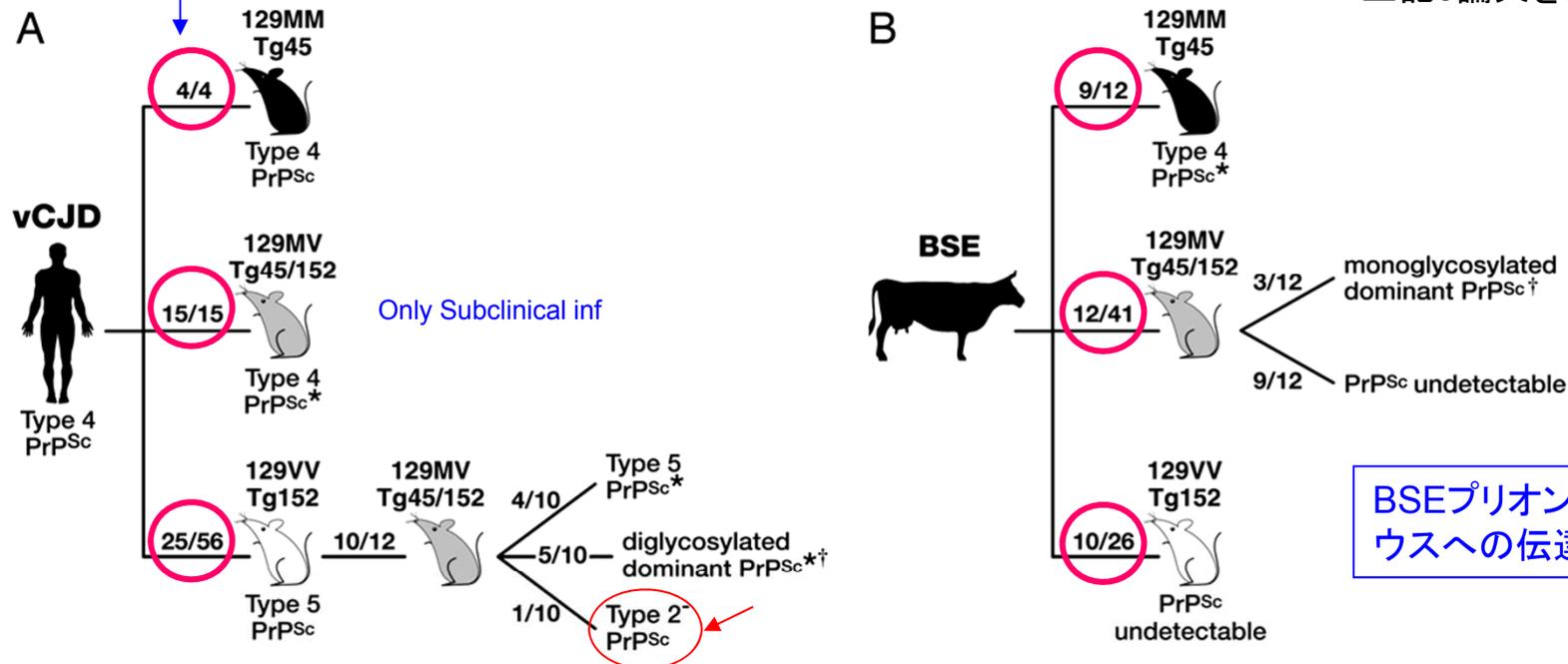
マウスPrP遺伝子がなく、ヒトPrP遺伝子をoverexpressionしたヒト型Tgマウス

Asante EA, Linehan JM, Gowland I, Joiner S, Fox K, Cooper S, Osiguwa O, Gorry M, Welch J, Houghton R, Desbruslais M, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J. [Dissociation of pathological and molecular phenotype of variant Creutzfeldt-Jakob disease in transgenic human prion protein 129 heterozygous mice.](#) Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 11;103(28):10759-64. Epub 2006 Jun 29.

+ Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. Nature. 1997 Oct 2;389(6650):448-50, 526.

+ Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Gowland I, Wood AL, Welch J, Hill AF, Lloyd SE, Wadsworth JD, Collinge J. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. EMBO J. 2002 Dec 2;21(23):6358-66.

臨床、WB、IHCのどれかが陽性



上記3論文をまとめた図

BSEプリオンはヒト型Tgマウスへの伝達が良くない

**Fig. 1.** Summary of transmissions of vCJD (A) and BSE (B) prions to transgenic mice. The total number of prion-affected mice (both clinically and subclinically infected) is reported for each inoculated group: 129MM Tg45 mice (black), 129VV Tg152 mice (white), and 129MV Tg45/152 mice (gray). Animals were scored by clinical signs, immunoblotting for PrP<sup>Sc</sup>, and/or PrP immunohistochemistry. Transmissions to 129VV Tg152 and 129MM Tg45 mice have been published (10, 12). In transmissions producing distinct PrP<sup>Sc</sup> types, the number of samples positive for a particular PrP<sup>Sc</sup> type is reported as a proportion of the total number of affected mice. \*, only subclinical prion infection was seen. †, use of sodium phosphotungstic acid precipitation to detect low levels of PrP<sup>Sc</sup> precludes precise assignment of PrP<sup>Sc</sup> type (16).

Bishop MT, Hart P, Aitchison L, Baybutt HN, Plinston C, Thomson V, Tuzi NL, Head MW, Ironside JW, Will RG, Manson JC. Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol.* 2006 May;5(5):393-8.

BSEプリオンはウシTgマウスには感染するが、ヒトTgマウスには感染しない。vCJDプリオンはヒトTgマウスのMM, MV型に感染する。

	BSE				vCJD		
	BovTg	HuMM	HuMV	HuVV	HuMM	HuMV	HuVV
Susceptibility*	22/22 ●	0/18	0/23	0/22	11/17 ●	11/16 ●	1/16

700日以上

\*Positives confirmed by immunocytochemistry or lesion profile.

Table 2: Susceptibility to TSE disease comparison of Bov Tg and human transgenic mice inoculated with BSE or vCJD

ウシBSEプリオンは、ヒト型Tgマウスへの伝達は非効率的でバリアがあるが、他の種へは伝達可能。

二つの論文は同じマウスを使用（ヒトプリオン遺伝子をマウス遺伝子と取り替えたもの）

Plinston C, Hart P, Chong A, Hunter N, Foster J, Piccardo P, Manson JC, Barron RM. Increased susceptibility of human-PrP transgenic mice to bovine spongiform encephalopathy infection following passage in sheep. *J Virol.* 2011 Feb;85(3):1174-81. Epub 2010 Nov 17.

ヒツジ継代したBSEプリオンは、ヒト型マウス(MM129)で病変（脳に空胞変性やPK抵抗性プリオン沈着）をおこす

TABLE 1. Transmission of cattle BSE, experimental sheep BSE, and natural scrapie to gene-targeted human and bovine transgenic mice

TSE isolate	Mouse line									
	129/Ola		Bov6		HuMM		HuVV		HuMV	
	Incubation time <sup>a</sup>	No. affected <sup>b</sup>	Incubation time	No. affected	Incubation time	No. affected	Incubation time	No. affected	Incubation time	No. affected
Cattle BSE (brain pool)	447 ± 27	8/8	551 ± 12 <sup>c</sup>	22/22 <sup>c</sup>	>765	0/18 <sup>c</sup>	>793	0/22 <sup>c</sup>	>749	0/23 <sup>c</sup>
Sheep BSE inoculum 1	474 ± 22	11/11	564 ± 8	17/17	>812	1/20 ●	>812	0/23	>812	0/23
Sheep BSE inoculum 2	403 ± 17	23/23	487 ± 3	24/24	>750	16/23 ●	>650	0/23	>708	0/24
Natural scrapie 1	594, 705	2/15	>811	0/21	>685	0/24	>776	0/22	>671	0/23
Natural scrapie 2	510 ± 17	15/23	>647	0/24	>730	0/24	>710	0/24	>682	0/24

<sup>a</sup> Measured as days ± standard errors of the means and calculated from mice showing both clinical and pathological signs of TSE. >n represents the survival in days of the mice.

<sup>b</sup> Nu: →ヒツジプリオンはヒトに伝達する可能性や、他の種のBSEプリオンがヒトにリスクがある可能性を示す。

<sup>c</sup> Data are from Bishop et al. (4).

Kong Q, Zheng M, Casalone C, Qing L, Huang S, Chakraborty B, Wang P, Chen F, Cali I, Corona C, Martucci F, Iulini B, Acutis P, Wang L, Liang J, Wang M, Li X, Monaco S, Zanusso G, Zou WQ, Caramelli M, Gambetti P. [Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain](#). J Virol. 2008 Apr;82(7):3697-701. Epub 2008 Jan 30.

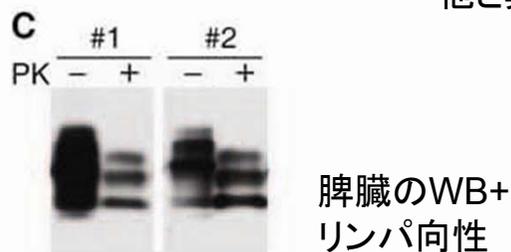
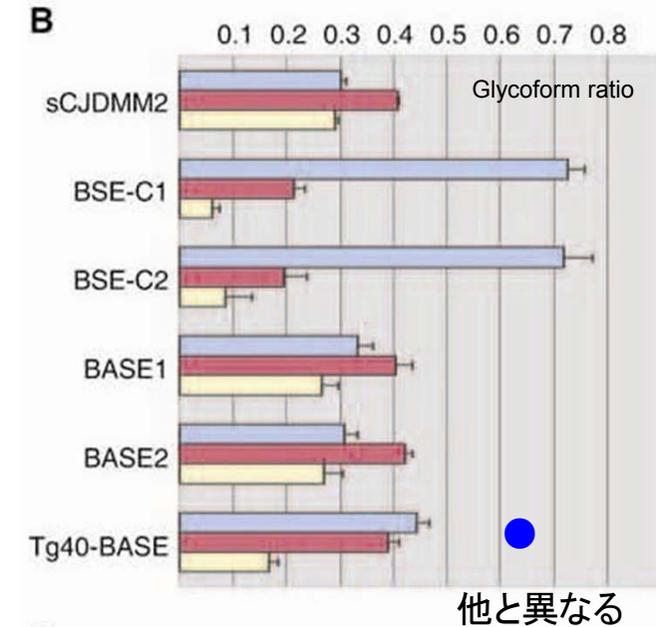
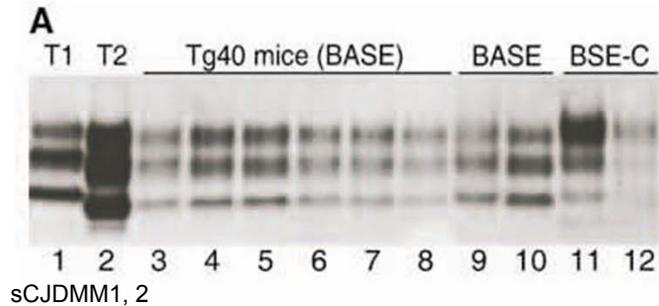
## 非定型BSE(BASE)とsCJDプリオンをヒト型Tgマウス(Tg40)に接種

TABLE 1. BASE transmission in Tg(HuPrP) mice

Inoculum	Attack rate as determined by:			Incubation time (days)
	Clinical signs	Presence of PrP <sup>Sc</sup>	Spongiform degeneration	
BASE-1	4/15	9/15	1 (focal)/8	649 ± 34
BASE-2	6/15	9/15	1 (focal)/11	595 ± 28
sCJDMM1	10/10	9/10	4/4	263 ± 13 <sup>a</sup>
sCJDMM2	9/9	9/9	7/7	267 ± 17

<sup>a</sup> Reported previously (13).

BASE2例の脳乳剤をヒト型Tgマウス(Tg40:129MM、発現程度は通常)の脳内に接種  
 20-22ヶ月後に60%が感染(cBSEよりも頻度は高い)  
 1/4は脾臓に陽性なのでリンパ向性と考えられる(sCJD接種では陰性)  
 アミロイド斑はなく、海綿状変性が少なく、長い潜伏期間を示す。  
 (sCJD接種例とは逆の所見)



Béringue V, Herzog L, Reine F, Le Dur A, Casalone C, Vilotte JL, Laude H. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg Infect Dis.* 2008 Dec;14(12):1898-901.

定型BSEより、非定型BSEのL-BSEはヒト型Tgマウス(129M)で効率的に増殖、H-BSEは感染しなかった。

Tg650マウス(6倍以上の過剰発現、vCJDは伝達可)

Table. Transmission of classical and atypical BSE isolates to transgenic mice expressing human prion protein (Met<sup>129</sup>)\*

Isolate	Origin (identification no.)	1st passage		2nd passage		3rd passage	
		Total affected†	Mean survival time‡	Total affected†	Mean survival time‡	Total affected†	Mean survival time‡
BSE	France (3)	1/6§	872	6/7	568 ± 65	8/8	523 ± 22
	France (3)	2/6	627, 842				
	Germany¶	1/4§	802	6/6	677 ± 54	8/8	555 ± 24
	Italy (128204)	0/5	606–775				
	Belgium	0/4	696–829				
L-type	Italy (1088)	9/9	607 ± 23	1/11	653 ± 13		NA
	France (7)	7/7	574 ± 35	0/8#	>450		
	France (10)	8/8	703 ± 19				
	France (11)	9/9	647 ± 26				
H-type	France (1)	0/6	376–721	0/7	350–850		NA
	France (2)	0/6	313–626	0/8	302–755		NA
	France (5)	0/10	355–838		NA		

\*BSE, bovine spongiform encephalopathy; NA, not available (experiments still ongoing).

†Mice with neurologic signs and positive for protease-resistant prion protein by Western blotting.

‡Days ± SE of the mean. For mice with negative results, only the range of survival time is given.

§First passage performed on hemizygous mice. Note that the primary transmission of France (3) isolate was performed on both hemizygous and homozygous mice.

¶One passage on transgenic mice expressing bovine prion protein (7).

#Ongoing experiment.

Histoblotデータあり、cBSEとL-BSEは違う

Wilson R, Plinston C, Hunter N, Casalone C, Corona C, Tagliavini F, Suardi S, Ruggerone M, Moda F, Graziano S, Sbriccoli M, Cardone F, Pocchiari M, Ingrosso L, Baron T, Richt J, Andreoletti O, Simmons M, Lockey R, Manson J, Barron R.  
 Chronic Wasting Disease and Atypical forms of BSE and scrapie are not transmissible to mice expressing wild-type levels of human PrP. J Gen Virol. 2012 Apr 11. [Epub ahead of print]

417 **Table 1.** Transmission of BASE, BSE-H, CWD and atypical scrapie to human and  
 418 bovine PrP Tg mice.  
 419

TSE Isolate	Mouse Line									
	HuMM		HuMV		HuVV		Bov6 <sup>†</sup>		129/Ola <sup>‡</sup>	
	Survival Time	No. affected	Survival Time	No. affected	Survival Time	No. affected	Survival Time	No. affected	Survival Time	No. affected
BASE (Roslin)	>687	0/24	>672	0/24	>763	0/24	547±18*	24/24 <sup>†</sup>	>687	1/24 <sup>†</sup>
BASE (Milan)	>753	0/23	>700	0/23	>726	0/19	na	na	na	na
BASE# 1 (Rome)	>633	0/19	>680	0/14	>707	0/17	na	na	na	na
BASE#2 (Rome)	>604	0/16	>854	0/29	>740	0/20	na	na	na	na
BSE-C (Rome)	>592	0/14	>856	0/15	>509	0/13	na	na	na	na
BSE-H	>722	0/24	>708	0/24	>708	0/24	561±15*	17/23 <sup>†</sup>	675±19*	5/23 <sup>†</sup>
CWD	>680	0/24	>730	0/24	>722	0/24	>716	0/23	457,707	2/24 <sup>†</sup>
Sheep passaged atypical scrapie	>693	0/24	>693	0/24	>693	0/24	>693	0/24	>693	0/24
Atypical scrapie ARR/ARR1	>651	0/23	>724	0/21	>829	0/24	>781	0/24	>753	0/24
Atypical scrapie AHQ/AHQ1	>822	0/24	>718	0/24	>682	0/22	>757	0/23	>710	0/11
Atypical scrapie ARR/ARR2	>722	0/24	>744	0/24	>841	0/23	>756	0/22	>673	0/12
Atypical scrapie AHQ/AHQ2	>786	0/22	>768	0/23	>700	0/24	>805	0/24	>779	0/21
Atypical scrapie AFRQ/AFRQ1	>815	0/24	>717	0/23	>759	0/23	>757	0/23	>772	0/24

CWD, 非定型BSE, scrapieはヒト型Tgマウスに病変を起こさない

-BSEはヒトにリスクあり  
 -非定型BSE、CWD、Scrapieのヒトへのリスクをヒト型Tgマウスで検討

IC 20ul, 10<sup>-1</sup>脳乳剤  
 IC+ip(100ul)

非定型BSE、CWD、ScrapieはヒトTgマウスへの接種後、疾患の病理像はえられない  
 →伝達は不可  
 →相当なバリアがある。

一つ欠けている

ヒトTgマウス 129MM, MV, VV

ウシ

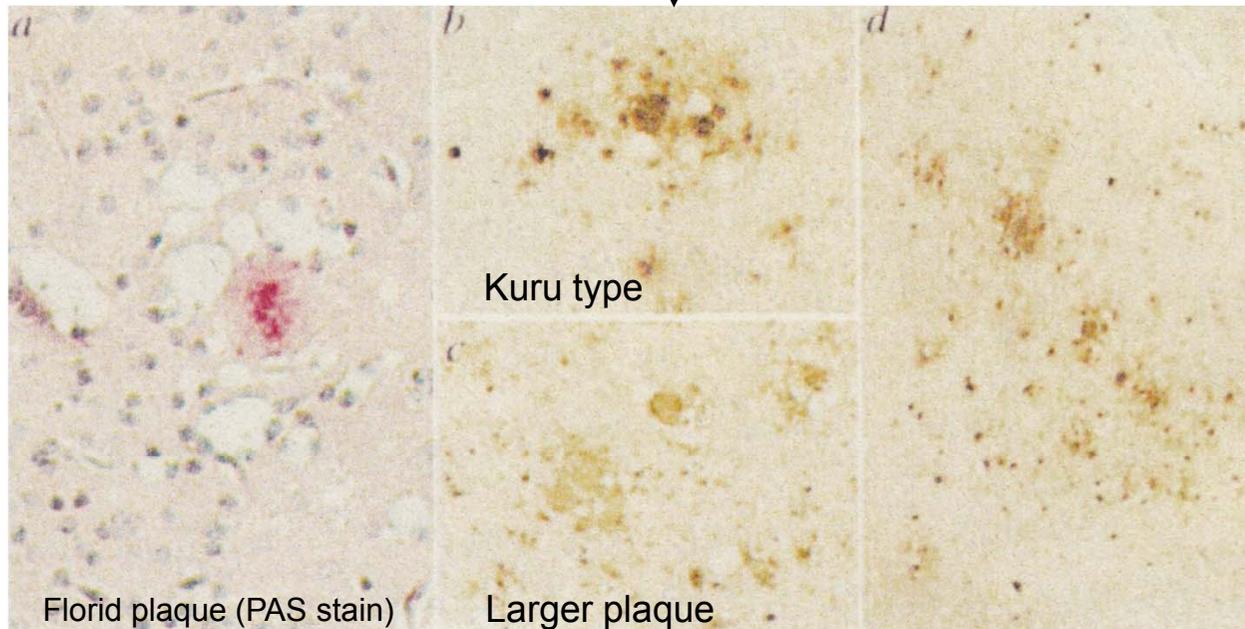
非Tgマウス=対照

## 定型BSEをサルに接種-1

Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ. [BSE transmission to macaques. Nature. 1996 Jun 27;381\(6585\):743-4.](#)

2頭の成獣カニクイサルと1頭の新生獣カニクイサルにBSEの25%脳乳剤を脳内接種したところ、成獣では150週に中枢神経症状を示し10-11週後に安楽殺した。新生獣サルは128週で同様の症状を呈し23週後に安楽殺したところ、ヒトのvCJDと同じ病理学的所見であることを示した

(vCJDの発表のあとの論文)

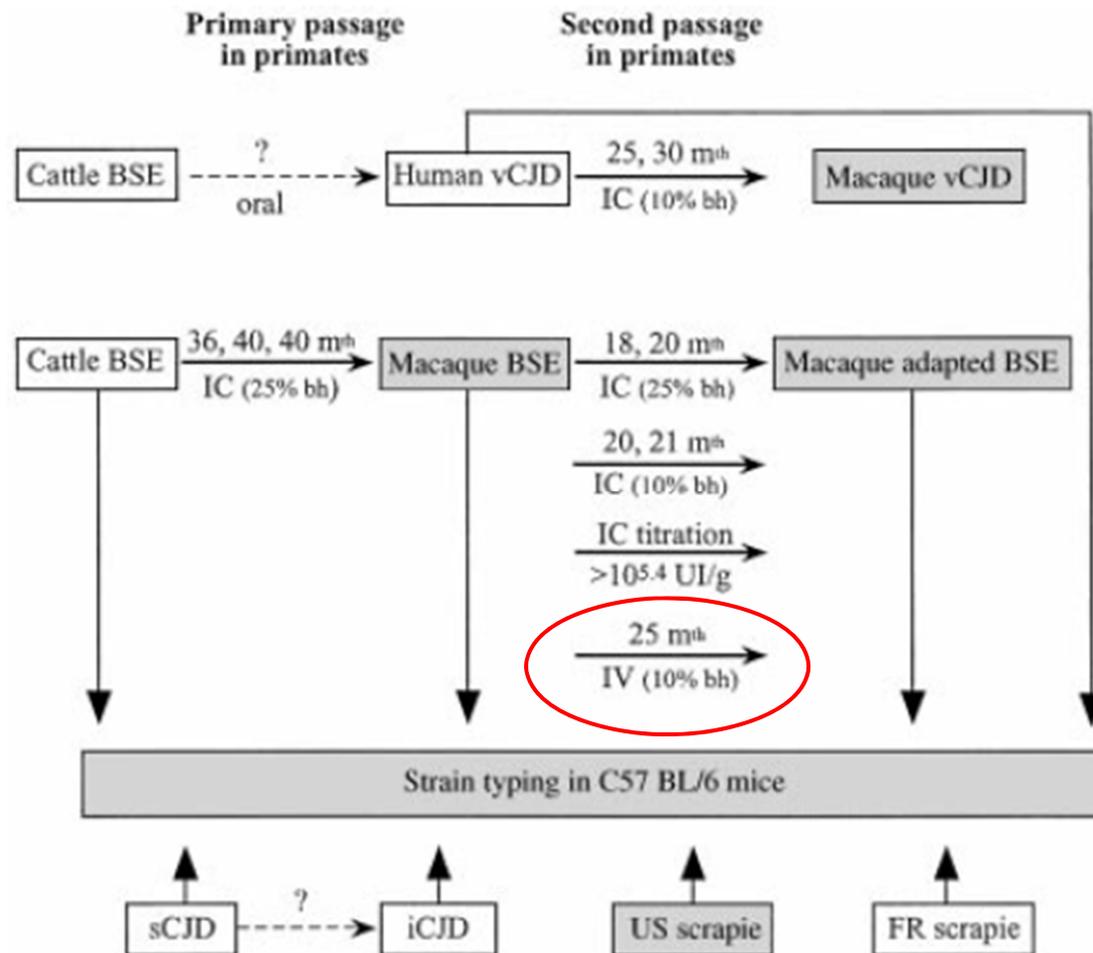


Cerebral cortex of the youngest monkey. *a*, PAS staining of a florid plaque; *b-d*, PrP immunohistochemistry showing pericellular deposits, kuru-type PrP plaques associated with vacuoles (*b*) and larger uni- or multicentric plaques (*c*). These plaques were also seen in the cerebellum, together with multiple smaller plaques in the granular layer. Immunostaining in the thalamus revealed intense widespread granular and perivacuolar deposition, as well as linear tract-like deposits within the grey matter. PrP immunostaining was performed with the monoclonal antibody 3F4 according to a method previously described<sup>8</sup>.

## 定型BSEをサルに接種-2

Lasmézas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marcé D, Lamoury F, Kopp N, Hauw JJ, Ironside J, Bruce M, Dormont D, Deslys JP. [Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt–Jakob disease: implications for human health. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98\(7\):4142-7. Epub 2001 Mar 20.](#)

ヒトのvCJDをサルの脳内接種による感染実験では25-30ヶ月で発症し、サルBSEからサルへは脳内接種でほぼ同様の潜伏期間で発症すること、脳内接種で接種量を変化させると $10^{-1}$ で20-21ヶ月、 $10^{-2}$ で28ヶ月、 $10^{-3}$ で33ヶ月、 $10^{-5}$ で38-48ヶ月後に発症した。静脈内接種では25ヶ月で発症し、その病理像はこれまでと同じ



### 定型BSEをサルに接種-3

Lasmézas CI, Comoy E, Hawkins S, Herzog C, Mouthon F, Konold T, Auvré F, Correia E, Lescoutra-EtcheGARAY N, Salès N, Wells G, Brown P, Deslys JP. [Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. Lancet.2005 Feb 26-Mar 4;365\(9461\):781-3.](#)

BSEプリオンの経口感染効率とヒトへの生物学的バリアの程度を知るために、5gのBSE脳組織をカニクイサルに経口接種した。一頭は60ヶ月で発症し63ヶ月で安楽死、もう一頭は76ヶ月でも感染は成立しなかった。72ヶ月時に扁桃生検を行ったが陰性であった

→サルへのBSEプリオンの経口感染では、1/2が発症した

Herzog C, Salès N, EtcheGARAY N, Charbonnier A, Freire S, Dormont D, Deslys JP, Lasmézas CI. [Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. Lancet. 2004 Feb 7;363\(9407\):422-8.](#)

静脈内接種と経口接種を比較すると、静脈内接種の方が潜伏期が短く、リンパ組織、パイエル板、神経線維、交感神経、扁桃や脾臓にプリオンが陽性となった。医原性の感染リスクを示唆した

Herzog C, Rivière J, Lescoutra-EtcheGARAY N, Charbonnier A, Leblanc V, Salès N, Deslys JP, Lasmézas CI. [PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. J Virol. 2005 Nov;79\(22\):14339-45.](#)

vCJD、sCJD、iCJDそしてBSEをサルの脳内に10%脳乳剤を400ul接種し、リンパ節、脾臓、扁桃、パイエル板、末梢神経、筋肉、副腎、腸管へのプリオンの沈着を調べた。BSEとvCJDプリオンはsCJD、iCJDと異なり、リンパ節、脾臓、扁桃、腸管パイエル板に存在した。

→BSEをサルに接種すると、vCJDと同様、リンパ系組織へ沈着する傾向にある

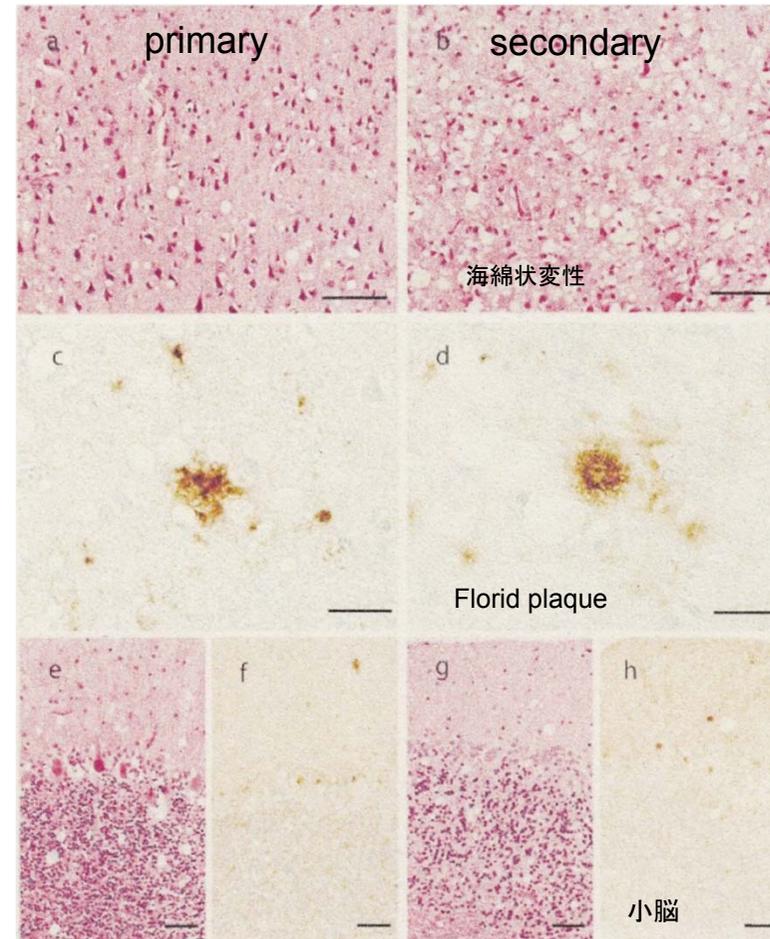
## 定型BSEをサルに接種-4

Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Kurosawa A, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T. [Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy \(BSE\) to cynomolgus macaques, a non-human primate. Jpn J Infect Dis. 2011;64\(1\):50-4.](#)

BSEの10%脳乳剤をサルの脳内に200ul接種し、29-44ヶ月で発症し、その後8-15ヶ月で安楽死させた。サルBSEの脳をサルに継代接種したところ、潜伏期は短縮し、13-15ヶ月で発症し5-6ヶ月で安楽死させた。病理像はvCJDと類似し、WBでもBSEプリオンと一致した。リンパ系組織への沈着がみられなかったのがこれまでの報告と異なっていた

Table 1. Signs and symptoms observed during the transmission of BSE to macaques

Transmission	Primary			Secondary		
	Monkey #	#7	#10	#11	#16	#17
Inoculated age (mo)		24	28	29	25	24
Onset (mo)		29	27	44	15	13
Disease duration (mo)		8	8	15	5	6
Abnormal behaviors:						
Depression		-	+++	-	+	-
Self harm behavior		+	-	+	-	-
Anorexia		+	-	+	-	+
Scordinema		-	+	-	-	-
Hyperekplexia		+++	+++	++	++	++
Neuronal symptoms:						
Ataxia		+++	+++	+++	++	+++
Tumor		+++	+++	+++	+	++
Myoclonus		++	++	++	-	++
Paralysis		+++	++	+++	+	++
Astasia		+++	++	+++	-	+



2回目の病理像はより高度になった。

## 非定型BSEをサルに接種-1

Comoy EE, Casalone C, Lescoutra-Etcheagaray N, Zanusso G, Freire S, Marcé D, Auvré F, Ruchoux MM, Ferrari S, Monaco S, Salès N, Caramelli M, Leboulch P, Brown P, Lasmézas CI, Deslys JP. [Atypical BSE \(BASE\) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. PLoS One. 2008 Aug 20;3\(8\):e3017.](#)

15年の無症状BASE例の脳幹部の10%脳乳剤250ulを一頭のカニクイサルの脳内に接種した。cBSEとvCJDについても2頭、4頭のサルに対照として接種した。短い生存期間(26ヶ月vs 40ヶ月cBSE)、臨床症状(21ヶ月で振戦とミオクローヌス、協調運動障害、vs 攻撃性)、病理(海綿状変性とグリオーシスが前頭葉、頭頂葉でシナプスパターン、vs 後頭葉、閤や小脳で凝集や班がみられる)、プリオン型が異なっていた。Octa-repeat領域のPK感受性が高い。これはヒトのMM2と同じ生化学的性状を示していた。この時点で経口感染実験は60ヶ月経っているが症状はない。

Ono F, Tase N, Kurosawa A, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Terao K, Sata T. [Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy \(L-BSE\) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate. Jpn J Infect Dis. 2011;64\(1\):81-4.](#)

L-BSEの10%脳乳剤を200ul 2才前後のカニクイサル2頭の脳内に接種。19-20ヶ月で症状出現し、24-25ヶ月で安楽死。従来のcBSEよりも早い。海綿状態が高度、シナプス型のプリオン沈着、班や花冠状アミロイド班はみない。プラークは小脳にみられた。WBパターンは接種したLBSEのものと同様でやや大きい。リンパ節等には検出できなかった。サルにはcBSEに比べて病原性が高いが、経口感染実験の結果が必要。実験中。

## 非定型BSEをサルに接種-2

Mestre-Francés N, Nicot S, Rouland S, Biacabe AG, Quadrio I, Perret-Liaudet A, Baron T, Verdier JM. [Oral transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy in primate model. Emerg Infect Dis. 2012 Jan;18\(1\):142-5.](#)

mouse lemurs (ネズミキツネザル)

L-BSE脳組織の10%乳剤を5%グルコースで作成し投与。19-22ヶ月後に脳内接種サル4頭すべてが神経症状陽性。経口投与5mgの一頭も同様な症状を示し27ヶ月で安楽死。視床から採取した脳組織のWBはみな同じ。バンドパターンで2糖鎖が強い。高度の海綿状態は、皮質や海馬では少ない。脳内および経口接種でも同じ。シナプスパターンでIHC陽性。一部は粗大顆粒状。経口接種サルは長生きし、臨床症状はやや軽く、運動機能障害がない。

Table. Experimental transmission of cattle-derived L-BSE agent to 12 mouse lemurs, by 2 routes of inoculation\*

Inoculation route	L-BSE dose, mg	Inoculated animals			
		No. inoculated (no. alive)	Age at inoculation	Survival after inoculation, mo	Positive for PrPd†
Intracerebral	5	4	1 y	19; 19.5; 22; 22	4/4
Oral	50	3 (1‡)	2 mo or 2 y	18‡; 32	2/2
Oral	5	5 (2‡)	2 mo or 2 y	27; 33; 34	2/3

\*L-BSE, L-type bovine spongiform encephalopathy source; PrPd, disease-associated prion protein. Source of L-BSE, 02-2528.  
†Results obtained by Western blot analysis and/or paraffin-embedded tissue-blot analysis and/or immunohistochemical analysis.  
‡Animals were inoculated at 2 y of age.



カニクイサルを用いた経口感染実験の結果報告は  
2012年6月現在、いまだない

文献から得られた伝達(感染)効率の比較(イメージ)

プリオン	脳内接種			経口接種
	ウシ型 Tgマウス	ヒト型 Tgマウス	サル	サル
ウシ定型 BSE	3+	- ~ +	+ 長い潜伏期間	+ (1/2)
ウシ非定型 BSE	2+	- ~ 2+	2+ c-BSEの半分の期間	+ (lemur) - 60M in progress