

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	BSEにおける脊柱・筋肉内神経組織のリスク評価と経口摂取 β シート蛋白の体内動態
主任研究者名	所属： 東京大学大学院農学生命科学研究科 氏名： 小野寺 節(研究課題番号：0503)

○研究要旨

本研究は、経口摂取されたプリオンの消化管における吸収伝播メカニズムおよび、筋肉内の末梢神経ならびに脳脊髄に由来する神経組織のリスク評価を行うために、高齢牛、若齢牛およびマウスを用いてシミュレーション実験を行い、相対的なリスク評価を行うための基礎的知見を得ることを目的とする。

① β アミロイドの腸管吸収過程および伝播経路の解明：BSE の原因である異常プリオンに類似した構造をもつ β アミロイド（ β シート構造）をマウスおよび牛（若齢牛）に投与し、腸粘膜、腸管壁および近傍の神経組織、リンパ組織における分布を明らかにする。

② 筋肉中の末梢神経分布の定量的解析：高齢牛（7歳以上）の枝肉をもとに頸部、胸部、腰部、臀部、後肢から一定量の肉片を採取した後、切片を作製し、一定面積内に含まれる神経組織の割合を免疫組織化学的方法によって測定する。また、ほぼ同じ部位から得られた組織に含まれる正常型プリオンの量をELISA法で測定し、中枢神経系における正常型プリオン量との比較を行う。

③ ②と同様に、若齢牛（1ヵ月以下）の枝肉をもとに、頭部、胸部、腰部、臀部、後肢から一定量の肉片を採取した後、切片を作製し、一定面積内に含まれる神経組織の割合を免疫組織化学的方法によって測定する。また、ほぼ同じ部位から得られた組織に含まれる正常プリオンの量をELISA法で測定し、中枢神経系における正常プリオン量との比較を行う。

①の結果については、15日齢の牛に β アミロイドを投与したところ、小腸粘膜上皮より直接蛋白の取込みが見られた。 β アミロイドとPrP^{Sc}の吸収の相違を比較するために、15、20、25日齢のマウスにこれらの蛋白を経口投与し、体内動態を観察した。PrP^{Sc}については、テクノビット包埋後、免疫組織化学的に検出した。その結果、 β アミロイドPrP^{Sc}も同様の吸収像が観察された。20日齢よりgut closureが観察され、25日齢では全く吸収像が観察されなかった。

②については、パラフィン切片を作製後、画像解析により神経成分を測定した。腸管により多くの神経成分が見られた。

③については、新生牛において、最も神経成分の比率が多く見られた。これは、組織の未発達によると考えられる。しかし、ELISAによるPrP^C量では、1ヶ月齢に近い若齢牛に、PrP^C量の低値が見られ、老齢牛で、重量あたり、より多くのPrP^C量が検出された。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	BSEにおける脊柱・筋肉内神経組織のリスク評価と経口摂取 β シート蛋白の体内動態 (研究期間：平成17年度～19年度)
主任研究者名	所属： 東京大学大学院農学生命科学研究科 氏名： 小野寺 節(研究課題番号：0503)

1. 研究の概要

本研究は、経口摂取されたプリオンの消化管における吸収伝播メカニズムおよび、筋肉内の末梢神経ならびに脳脊髄に由来する神経組織のリスク評価を行うために、高齢牛、若齢牛およびマウスを用いてシミュレーション実験を行い、相対的なリスク評価を行うための基礎的知見を得ることを目的とした。

SRM 除去効果の評価についての基礎データを得る事により、中枢神経由来プリオンの汚染リスクが明らかにされる。また、筋肉内の末梢神経の割合、正常プリオン蛋白量腸内動態を明らかにする事により、食品としての牛腸管のリスクが明らかとされた。

◎：中課題責任者、○：小課題責任者

1) SRM 除去効果の評価手法の開発「◎小野寺」

①牛枝肉洗浄後の正常プリオン蛋白残留量及び処理工程の調査（○小野寺、九郎丸、吉川）（H. 17～19）

と畜解体された牛枝肉について、正常プリオン蛋白含有量を測定する。抜き取り部位は、最後胸椎周囲、第三頸椎周囲、頭部腹側（以上、内側、背割り面）及び外側腰部で、骨以外の部分の 100c m²とする。採取時期は洗浄前、洗浄後及び冷却後と各群数頭行う。正常プリオン蛋白は我々が開発したサンドイッチ ELISA を用いて行う。陰性コントロールとして、プリオン遺伝子欠損牛臓器を用いる。

②牛脊髄及び末梢神経の正常プリオン蛋白含有量（小野寺、○九郎丸）（H. 17～19）

牛脊髄（脳に最も近い部分）及び末梢神経を、細胞破碎装置を用い乳剤にした後、2 倍段階希釈し、1 g 中の正常プリオン蛋白量を測定する。脳全体の量を推定する為、数検体を用いる。

③牛肉の脳・脊髄組織添加回収実験（小野寺、○九郎丸）（H. 17～19）

洗浄後の枝肉を想定したモデル実験を行う。霧吹き器で湿らせた牛肉の表面 100c m²に、脊髄乳剤 0.1M l を添加する。その添加直後あるいは 4℃、24 時間保管後に綿棒で拭き取り GFAP を測定、回収率を算出する。また、脊髄乳剤添加後、牛肉を水道水あるいは熱酸水で 10 秒間洗浄し、同様に拭き取り、正常プリオン蛋白量を測定する。

2) 末梢神経系における感染リスクの評価[◎眞鍋]（H. 17～19）

94 ヶ月齢の BSE 感染乳用牛で、坐骨神経などの末梢神経系および副腎からプロテアーゼ A 消化抵抗性蛋白の存在が見出されている。そのため、7～8 歳の高齢泌乳牛を試験に用いる。と殺後、舌、C3～C4 部位の頸部の筋、T7～T8 部位の胸部の筋、大腿二頭筋、上腕三頭筋から採材し（H. 17、18）、それぞれの部位の一定面積の筋組織中に占める神経線維（軸索の径 0.5 μ m 以上）の面積を、共焦点レーザー顕微鏡および画像解析装置を用いて行う（○眞鍋、九郎丸）。また、筋肉内末梢神経および脊髄における正常プリオン蛋白の量を測定する（H. 18～19）。（○小野寺）

3) 経口摂取 β シート蛋白の体内初期動態[◎中山]（H. 17～19）

牛型 β アミロイド (APP695) 作製：株式会社プロテイン・エクスプレスが保有する無細胞系を含む各種タンパク質生産技術を利用して牛型 β アミロイド生産系を構築し、投与試験に供した。（恵比須）（H. 18）。また、対照として、マウスにおいても同様にマウス型 β アミロイドの経口投与を行った。さらに、筑波 1 株スクレイパー感染マウス脳乳剤も投与して、その動態を免疫組織化学的に明らかにした。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

末梢神経系における感染リスクの評価

病原性プリオン蛋白は、回腸末端部および扁桃より、末梢神経に伝達され、脳脊髄に侵入すると、推測されている。したがって、それらの仮説検証の基礎データを蓄積するため、骨格筋、舌および腸管組織中に含まれる末梢神経線維の割合を検討した。

実験方法としては、東京大学附属牧場産の60ヶ月齢、1ヶ月齢及び15日齢のホルスタイン雌について、屠殺、採材し、7種の筋肉から3ヶ所ずつ採材した。また、腸管は、十二指腸、空腸、回腸、結腸をそれぞれ3ヶ所、盲腸、直腸をそれぞれ1ヶ所採材した。10%ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、Neurofilament 150 抗体により、免疫組織化学を行った。その後、画像解析により、神経成分の面積を測定した。骨格筋では舌部に、多量の成分が見られ、腸管では、空腸、回腸部に、多数の筋層間神経が観察された。

ウシ筋肉および腸管における正常プリオン蛋白の定量

当研究グループに、サンドイッチエライザによる牛 PrP 検出系を確立し、末梢組織の中でも食用に供されることの多い舌、骨格組織及び腸管に注目し、その中に含まれる PrP^c 量の測定を行った。まず組換えマウス PrP を免疫原として作製され異なるエピトープをもつマウス抗 PrP モノクローナル抗体 T2、T17 をそれぞれ産生するハイブリドーマを培養し、その培養上清より抗体精製を行った。精製した各抗体にペルオキシダーゼを標識し、これらの標識抗体を用いたサンドイッチ ELISA による PrP 検出系を確立した。そして、このサンドイッチ ELISA により、東大附属牧場産乳牛から採材した各組織における PrP^c 検出を行った。また PrP^c 含有量は、組換えウシ PrP を検出した検量線より算出した。脳を除き、最も PrP^c 含有量の高い組織は頭最長筋 2.06 $\mu\text{g/g}$ で、以下高いほうから順に、胸腸助筋 1.98 $\mu\text{g/g}$ 、板状筋 1.89 $\mu\text{g/g}$ 、大腿二頭筋 1.54 $\mu\text{g/g}$ 、上腕三頭筋 1.30 $\mu\text{g/g}$ 、胸最長筋 1.11 $\mu\text{g/g}$ 、回腸 1.02 $\mu\text{g/g}$ 、空腸 1.00 $\mu\text{g/g}$ 、十二指腸 0.96 $\mu\text{g/g}$ 、結腸 0.92 $\mu\text{g/g}$ 、盲腸 0.80 $\mu\text{g/g}$ 、舌尖 0.71 $\mu\text{g/g}$ 、肩甲横突筋 0.50 $\mu\text{g/g}$ 、舌体後部 0.48 $\mu\text{g/g}$ 、舌体前部 0.42 $\mu\text{g/g}$ と続き、最小は舌根部 0.34 $\mu\text{g/g}$ であった。また、各組織の PrP^c 含有量は脳の 3.2~19.3% であった。本研究における PrP^c 含有量の測定は、PrP^{sc} 蓄積のリスク評価の一助となると考えられる。

同様の実験をマウス型 β アミロイド系についても実施した。

牛肉表面に付着した脳乳剤の乳酸による洗浄効果

米国では、と畜場で、背割りの後に、と体を乳酸で洗浄して、特定危険部位を洗浄している。したがって、この操作の小型モデルを牧場に設立し、牛脳乳剤の洗浄効果について検証した。

1%牛脳乳剤を作製し、肩、足、肋骨内側、腹の計4ヶ所に噴霧し、1分間静置した。その後、0.01%、0.1%、1%乳剤にて噴霧部を洗浄した。その後、牛表面の液体を採取し、500 μl の溶解バッファー[0.5% NP-40、0.5% SDS、PBS]に溶かし、サンドイッチエライザを行った。

洗浄前の ELISA の読みを 100 とすると、肩においては 0.01%乳酸で 6.1、0.1%乳酸で 14.1、1%乳酸で 14.7 の読みを得た。足部では、それぞれ、100、13.4、24.7、10.7 の読みを得た。肋骨内側では、100、13.3、18.1、23.5、の読みを得た。組織内に入り込んだ乳剤については洗浄困難であることが明らかとされた。一方、噴霧前の肉組織表面からは、PrP^c は検出されなかった。

ウシ型 β アミロイド生産系の構築

ウシ β シート蛋白質 (42aa、126bp) 発現系の構築

ウシ β シート蛋白質 (42aa、126bp) をコードする遺伝子 (126bp) を化学合成し、次いで PCR により

増幅した。得られた PCR 断片を大腸菌用発現ベクターpROX1 にクローン化し、2 種類の発現ベクター pROX-mA β 、pROX-cA β を構築した。それらの発現ベクターを用いて、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を用いて液体培養によるマウス並びウシ β シート蛋白質の発現試験を行ったところ、効率的な生産が確認できた。

その結果、A β -EGFP-A β の 2 種類の融合発現プラスミドの構築が可能となった。それらの蛋白の大腸菌においては、低温発現が有効となり、製造効率が高められた。その結果、715mg/50ml (A β -EGFP)、6.22mg/7.5ml (EGFP-A β) の作製が可能となった。また対照としての EGFP についても、3.62mg/2ml の作製を行った。

これらの産物について、東京大学農学部において、CD スペクトルを用いて、 β シート構造の割合を測定した。その結果、約 60%の割合で、 β シート構造の含まれる事が明らかとなった。

乳飲みマウスおよびウシにおける β シート蛋白質の腸上皮への取込み

はじめに、カーボンブラック微粒子 (CBP) および蛍光ラテックスビーズ (LFB) を用いて、生後 10 日の乳飲みマウスにおける経口投与物質の腸上皮への取込みの検出法の確立を行った。その結果、投与後 3 時間で腸絨毛の線条縁への吸着、6 時間以降で、上皮細胞内および間質へ取込まれた。パイエル板について、6 時間以降で LFB が蓄積していた。また、取込み細胞について、ローダミン標識 *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-1) およびアレクサフロー 30 標識 wheat germ agglutinin (WGA) で染色し、解析した結果、(UEA-1、WGA+) の円柱上皮細胞および (UEA-1-、WGA-) の内分泌細胞と考えられる細胞への吸着、その後の円柱上皮内取込みが観察された。CBP および LFB は異物であるに関わらず、異物の取込み作用を持つ M 細胞よりもむしろ主に栄養吸収作用を持つ円柱上皮細胞により主に取込みが行われていた。

次に、A β -EGFP と EGFP-A β およびアルブミン-Fluor の経口投与を行い、腸上皮への取込みを同様の方法により行った。その結果、A β -EGFP と EGFP-A β は 3 時間および 6 時間で腸絨毛上皮表面へ吸着し、上皮細胞内に取込まれた。6 時間では、絨毛間質への移動も見られた。またアルブミン-Fluor は検体投与時には微粒子状であったが、腸組織内で微粒子状の検出は行えず、腸上皮細胞内への取込みは、 β アミロイド蛋白質程確認できなかった。つまり、A β -EGFP と EGFP-A β は、 β シート蛋白質として胃腸および消化酵素に抵抗性があつたと考えられる。

また連続経口投与を行った結果、粘膜陰窩部およびパイエル板において、蛍光物質が検出された。これにより、パイエル板ドーム上皮細胞から取込まれ、上皮ドーム領域へ蓄積し、経時的に推移する事が考えられた。しかし、経時的観察では、A β -EGFP、EGFP-A β 、アルブミン Fluor は、腸絨毛の円柱上皮より取込まれている事が明らかとなった。この過程には、円柱上皮による非特異的な取込み後、分解処理して、抗原提示を行なう機構が関与していると考えられる。それらが分解されることなく、粘膜陰窩部およびパイエル板上皮ドーム領域へ蓄積すると考えられる。 β アミロイド蛋白質と、蛍光物質の融合蛋白質による取込みの機構解析は、プリオン病病原体の取込み機構のモデルとして有用であると考えられる。

15 日齢のウシにおいて、 α β -EGFP を経口カテーテルを用いて腸内に投与し、同様の実験、組織観察を行っていた。その結果、マウスと同様に、小腸上皮細胞を通じて、 β シート蛋白の取り込まれる事が明らかとなった。さらに、マウスを用いて、PrP^{Sc} の経口投与を行った。小腸上皮細胞の取込み像は、 α β -EGFP を用いた場合と同様であった。マウスにおける PrP^{Sc} の腸円柱上皮細胞内の検出は我々が独自に開発した抗 PrP モノクローナル抗体を用いた (参考論文 2、3)。したがって、若齢では PrP^{Sc} の小腸円柱上皮からの取込みは極めて効率的で、ベビーフード、代用乳には一層の配慮を用いる事の必要性が示された。

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

1. 「乳飲みマウスの腸上皮へのカーボンブラック微粒子の取込み」 中山 裕之他、獣医生化学 43, 23-25, 2006
2. Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Tagawa Y, Kimura KM, Nakamura I, Wu G, Sakudo A, Casalone C, Mazza M, Caramelli M, Takahashi H, Sata T, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Onodera T.
A monoclonal antibody (ID12) defines novel distribution patterns of prion protein (PrP) as granules in nucleus. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Feb 15; 366(3):657-663.
3. Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T.: Distinct immunohistochemical localization of Kuru plaques using novel anti-PrP antibodies. Microbiol. Immunol. 52:25-29, 2008.
4. Ano, Y., Nakayama, H., Sakai, Y., Sakudo, A., Endo, M., Ebisu, S., Li, J.Y., Uetsuka, K., Manabe, N., and Onodera, T.: Incorporation of β -amyloid protein through the bovine ileal epithelium before and after weaning: a model for orally transmitted amyloidosis. Microbiol. Immunol. 52: (4), 2008.
5. Ano, Y., Sakudo, A., Nakayama, H., and Onodera, T.: Uptake and dynamics of infectious prion protein in the intestine. Protein Pept. Lett. in press 2008.
6. Zhu, X.B., Matoba, S., Hara, K., Ano, Y., Kobayashi, S., Tusnekawa, N., Kanai, Y., Manabe, N., Onodera, T., and Kurohmaru, M.; Ration of peripheral nerous tissues in tongues, skeletal muscles and intestines in cows. Okajimas Folia Anatomica Japonica, in press 2008.

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他 (各種賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

「BSE 研究の現状：日本における羊スクレイピーの症例をモデルとして」 小野寺 節 「食の安全と感染症学 東京大学創立 130 周年記念事業、2008

3 今後の問題点等

すでに、老齢牛においては、筋肉内神経断面積は、全肉量の 0.1%に相当する事が明らかにされた。また、腸管については、さらなる量の神経成分が検出された。しかし、それが必ずしも正常プリオン蛋白の増量を反映しているものではない。もし、脳内に病原体が存在すれば、病気の末期には、容易に筋肉内に病原体が流入すると考えられる。今後は、この神経成分が上行性の神経成分か、下行性の神経成分かを、免疫組織化学的に明らかにされねばならない。

腸管からの取込みが一定の月齢後、見られなくなる(Gut Closure) 機構は、さらに明らかにされなければならない。現在は、教科書的には上皮細胞上の FC レセプターの量と、それに付着する自然抗体の量によると理解されている。

A β -EGFP の吸収は、また乳清の同時投与により増加した。これは、BSE 感染における代用乳リスクの評価に寄与するものであるが、さらに解明されねばならない。