

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	ヒト型遺伝子改変マウスを用いた非定型BSEの人に対する感染リスクの定量的評価 (課題番号：1301) (研究期間：平成25年度～平成28年度)
主任研究者名	研究者名：松浦 裕一 所属機関：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

牛海綿状脳症（BSE）の発生は激減したが、定型BSE（C-BSE）とは異なる病態を示す非定型BSEが老齢牛で散発的に発生する。C-BSEは単一の病態で、人に感染して変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因とされている。一方、非定型BSEは、L型（L-BSE）とH型（H-BSE）の2タイプが知られており、いずれも人に感染した例はないが、L-BSEについては実験的に人に感染する可能性が示唆されている。我々は、正常なアミノ酸多型を反映したヒトプリオン蛋白質を、内在性のプリオン蛋白質と同程度発現するヒト化マウスを樹立した。

本研究は、L-BSE、H-BSE、C-BSEの感染牛の脳乳剤をヒト化マウスの脳内、もしくは腹腔内や経口の末梢経路で投与する感染実験を行い、人への感染リスクを評価することを目的とした。

ヒト化マウスを用いた感染実験で、C-BSEは脳内や腹腔内ルートでヒト化マウス129Met/Met・219Glu/Glu、129Met/Met・219Lys/Lysに感染した。C-BSEが感染したとされる変異型CJDの患者は輸血による1例を除きすべて129Met/Met型であり、219Lys型の症例も1例で報告されことから、ヒト化マウスへの感染性はC-BSE感染における人の正常多型の影響を反映すると考えられた。一方、L-BSE、H-BSEは脳内や腹腔内投与後にいずれのヒト化マウスにも感染しなかったことから、非定型BSEのヒトへの感染リスクは、C-BSEより小さいと考えられた。

ヒト化マウスへの経口投与実験では、L-BSE、H-BSE、C-BSEいずれも感染しなかった。一方、感受性の高いウシ化マウスへの経口投与実験ではL-BSEやC-BSEは感染した。しかし、ウシ化マウスへの脳内投与後の感染性と比較すると、1/10,000より低い感染効率であった。また、L-BSEは、経口投与によるウシ化マウスへの感染性がC-BSEと比べて1/10、H-BSEは1/100以下であったことから、非定型BSEの経口感染性は少なくともC-BSEと比べて低いと考えられた。

ヒトの消化酵素を模した人工消化液とその後の100℃、10分間の熱処理では、C-BSEの感染性は全く失われなかった。これに対して、L-BSEやH-BSEは人工消化液でプリオン蛋白質の減少が見られ、100℃、10分間の熱処理で感染性は1/1,000以下に減少した。このことから、非定型BSEのプリオンはC-BSEに比べて非常に不安定であり、不活化し易いことが示された。

この研究課題では、非定型BSEがヒト化マウスに感染しなかったことから、人への感染リスクを定量的に評価できなかったが、C-BSEの牛からヒトへの感染にはヒトの遺伝子多型がリスクファクターとなりうること、非定型BSEの人への感染性がC-BSEと比べて低いことを明らかにした。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	ヒト型遺伝子改変マウスを用いた非定型BSEの人に対する感染リスクの定量的評価 (研究期間：平成25年度～平成28年度)
主任研究者名	所属：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 氏名：松浦 裕一（研究課題番号：1301）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成25年度～平成28年度

2 研究目的

牛海綿状脳症(BSE)は、牛への飼料規制をはじめとする各種対策が効を奏し、世界的にその発生は減少した。一方で、従来型のBSE(C-BSE)と、異なる性状を示す非定型と称されるBSEが散発している。非定型BSEにはL型(L-BSE)とH型(H-BSE)が存在し、それぞれC-BSEと異なった病態である。さらに、非定型BSEは、感染様態も起源も不明であり、散発性に発生する人の孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)と同様に、孤発性BSEの可能性が示唆されている。人への感染はまだ報告されていないが、非定型BSEがヒト型プリオン蛋白質遺伝子改変マウス、カニクイザルに感染性を示し、ネズミキツネザルでは経口投与でも感染性を示すことが報告された。この研究課題では、ヒト型遺伝子改変マウスを用いて非定型BSEの人への感染リスクを評価することを目的とする。

非定型BSEの人に対する感染リスク評価と比較病理学的解析は適正な感染実験モデル以外ではなし得ない。ヒトのプリオン蛋白質遺伝子は、コドン129がメチオニン(Met)もしくはバリン(Val)、コドン219番目がグルタミン酸(Glu)もしくはリシン(Lys)のアミノ酸の正常多型が存在する。われわれは相同組換えの手法を用いてヒト型プリオン蛋白質遺伝子をマウスのプリオン蛋白質遺伝子と組換えて導入した、いわゆるノックインマウスのモデル(ヒト化マウス)を作製済みであり、それぞれの多型:129Met/Met・219Glu/Glu、129Met/Val・219Glu/Glu、129Val/Val・219Glu/Glu、129Met/Met・219Lys/Lysを樹立している。また、同じ導入遺伝子カセットにより作製されたウシ型プリオン蛋白質遺伝子を導入した、ウシ化マウスも有している。これらのマウスは、導入されたプリオン蛋白質の発現部位も発現量も野生型マウスと同等であり、プリオン蛋白質遺伝子以外の遺伝的背景も同一である。これらのマウスを用いた非定型、定型BSEの感染実験によって、遺伝子多型の影響を明らかとすることが可能となる。

本研究では、非定型BSE、定型BSEの感染性をヒト化マウスもしくはウシ化マウスの腹腔内、脳内、経口とそれぞれの経路で投与して、感染性を調べることで、非定型BSEと定型BSEの相違を明確にすることのみならず、非定型BSEの感染リスクを評価することが可能となる。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
(1) 遺伝子改変マウスを用いた非定型BSEの感染性の解析	1)脳内投与によるBSEの感染性の定量的評価 2)腹腔内投与によるBSE感染性の定性的評価 3)経口投与によるBSEの感染性と体内分布の比較解析 4)BSEの高濃度暴露によるヒト化マウスへの経口感染性の検討 5)BSEのウシ化マウスへの経口感染性の検討	松浦 裕一（国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門）
(2) 異常プリオン蛋白質の生化学的性状の比較解析	1)非定型BSE発病ヒト化マウスでの異常プリオン蛋白質の生化学的性状解析 2)非定型BSEの異常プリオン蛋白質の消化酵素液による分解性の比較検討	H25-H26 横山 隆（国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門） H27-H28 松浦 裕一（国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門） H27-H28 宮澤 光太郎（国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門）

4 倫理面への配慮について

動物実験の計画は動物衛生研究部門動物実験委員会にて承認され(承認番号 13-008、14-102)、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日付け 18 農会第 307 号）」に基づく国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験等実施規程を遵守して実施した。遺伝子改変動物の使用は、動物衛生研究部門組換え生物等使用安全委員会で承認された(承認番号 A-12-013)。BSE プリオンを用いた実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会で承認され(許可番号第 13-III-1 号)、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症実験指針（平成 15 年 10 月）」を遵守して実施した。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：遺伝子改変マウスを用いた非定型 BSE の感染性の解析

国内 24 例目 L-BSE の実験感染牛、カナダ由来 H-BSE の実験感染牛、もしくは英国由来 C-BSE の野外発生牛の脳を末梢ルート(腹腔内もしくは経口)、もしくは脳内ルートで、4 系統のヒト化マウス (129Met/Met・219Glu/Glu, 129Met/Val・219Glu/Glu, 129Val/Val・219Glu/Glu, 129Met/Met・219Lys/Lys) および 1 系統のウシ化マウスに投与して、BSE の感染性を比較解析することを目的として、個別課題のとおり実施した。マウスへの BSE 感染は、発症、免疫組織化学染色法(IHC)による異常プリオン蛋白質(PrP^{BSE})の検出、ウエスタンブロット法(WB)による蛋白分解酵素消化に抵抗性のプリオン蛋白質の解析により総合的に判定した。

1) 個別課題名：脳内投与による BSE の感染性の定量的評価

(松浦 裕一 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門))

BSE の感染性を評価するためには、脳内投与後マウスが発症するまでの潜伏期間を求めることが必要である。そこで、BSE (L-BSE, H-BSE, C-BSE) 牛の 10%脳乳剤 (0.02mL) をヒト化マウスの脳内に投与して、状態を観察した。C-BSE では、ヒト化マウスのうち、129 番目のコドンがメチオニン (Met) ホモかつ 219 番目がリシン (Lys) ホモのヒト化マウス (129Met/Met・219Lys/Lys) で、脳内投与後 7 頭中 3 頭 (投与後 796 日、824 日、839 日) の脳に PrP^{BSE} の蓄積が認められた (表 1)。他の遺伝子型のヒト化マウスは、脳内投与後 800 日以上観察しても BSE 感染による臨床症状や PrP^{BSE} の蓄積が認められなかった。他方、L-BSE、H-BSE では、いずれのヒト化マウスも脳内投与後 800 日以上観察おこなったが BSE の発病や PrP^{BSE} の蓄積が認められなかった (表 1)。

なお、WB による、C-BSE 感染ヒト化マウスの脳における PrP^{BSE} のバンドパターンの解析は“研究項目:(2)異常プリオン蛋白質の生化学的性状の比較解析”の個別課題 1) で実施した。

2) 個別課題名：腹腔内投与による BSE 感染性の定性的評価

(松浦 裕一 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門))

われわれのモデルマウスでは、BSE 等プリオンの腹腔内投与後最短で 2 週間ぐらいから脾臓のろ胞樹状細胞(FDC)に PrP^{BSE} が蓄積することが知られている。この現象は FDC バイオアッセイとして、感染性を検出する指標として用いられる。BSE の末梢からの感染性を迅速に評価するために、BSE (L-BSE, H-BSE, C-BSE) 牛の 10%脳乳剤 (0.5 mL) をヒト化マウスの腹腔内に投与した。150 日後にヒト化マウスを安楽死し、FDC における PrP^{BSE} の蓄積を IHC と WB で調べた。その結果、C-BSE では、129Met/Met・219Lys/Lys マウスに加えて、129Met/Met・219Glu/Glu マウスの脾臓で PrP^{BSE} が検出され、129Met/Met・219Lys/Lys で 10 頭中 10 頭、129Met/Met・219Glu/Glu で 8 頭中 3 頭の検出率であった (表 2)。しかし、L-BSE や H-BSE の投与では、

いずれのヒト化マウスの脾臓でも PrP^{BSE}は検出されなかった（表 2）。

この結果は、C-BSE が腹腔内ルートでヒト化マウス(129Met/Met・219Lys/Lys と 129Met/Met・219Glu/Glu)に感染したことを示す。C-BSE 感染の陽性率から、129Met/Met・219Lys/Lys のヒトプリオン蛋白質が 129Met/Met・219Glu/Glu と比べて BSE プリオンに感染しやすいことが考えられた。他方、L-BSE や H-BSE は腹腔内投与 150 日後までにマウスの脾臓で PrP^{BSE} が検出できず、感染が成立しなかった。このことから、非定型 BSE は従来型と比べて末梢からの感染が成立しにくいことが示唆された。

3) 個別課題名：経口投与による BSE の感染性と体内分布の比較解析

(松浦 裕一 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門))

L-BSE、H-BSE、C-BSE それぞれの感染ウシの 10%脳乳剤の 0.05 mL(脳湿重量：5 mg)を、胃ゾンデを用いてヒト化マウスに経口投与した。ヒト化マウスは経口投与後 850 日以上を観察をおこなったが、いずれも BSE プリオンによる症状は認められなかった。老化およびその他の疾病により一般状態が悪化するなど、経口投与後安楽死させた個体の脳やせき髄、脾臓にも PrP^{BSE} は検出されなかった（表 3）。腸間膜リンパ節や小腸のパイエル板にも PrP^{BSE} は IHC で検出されなかった。

L-BSE、H-BSE、C-BSE いずれも、5 mg の脳湿重量の経口投与でヒト化マウスに感染しなかったことから、BSE の体内分布も試験できなかったため、投与量を 10 倍に増加させた、高濃度暴露による BSE 感染実験を個別課題 4) で実施した。

4) 個別課題名：BSE の高濃度暴露によるヒト化マウスへの経口感染性の検討

(松浦 裕一 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門))

この課題では、BSE 牛脳をすりつぶしただけのペースト状のマセレートの 0.05 mL(脳湿重量：50 mg)をヒト化マウスに経口投与した。個別課題 3) より 10 倍高い濃度での感染実験であったが、経口投与後 831 日～860 日まで観察したが、いずれのヒト化マウスも BSE による症状を呈さず、脳やせき髄、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸のパイエル板に PrP^{BSE} が検出されなかった（表 4）。

L-BSE、H-BSE、C-BSE は、50 mg のウシ脳湿重量を経口投与してもヒト化マウスに経口感染しなかった。このことは、BSE がヒト化マウスへ経口的感染しにくいことを示唆しているのか、マウスそのものの消化管のシステムが経口感染に適していないのかは、さらなる検討が必要である。

5) 個別課題名：BSE のウシ化マウスへの経口感染性の検討

(松浦 裕一 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究

機構 動物衛生研究部門)

L-BSE、H-BSE、C-BSE の経口ルートによる遺伝子改変マウスへの感染性について C-BSE と定量的に比較するため、BSE 感染ウシ脳について終末限界希釈法によるウシ化マウスへの経口感染実験を行った。経口投与後最長 856 日の観察をおこなったが、いずれのウシ化マウスも BSE の症状を示さなかった。L-BSE のマセレート (100%) 投与群で 853 日に安楽死したウシ化マウスの脾臓で PrP^{BSE} が検出されたが、脳では検出できなかった (表 5)。濃度 10% 以下の経口投与群には L-BSE 感染ウシ化マウスはいずれも検出されなかった。C-BSE では、100% 経口投与群のウシ化マウスのうち、763 日と 809 日で突然死した 2 頭の脳に PrP^{BSE} が検出された。C-BSE の 10% 脳乳剤経口投与群では 770 日で安楽死したウシ化マウスの脾臓に PrP^{BSE} が WB で検出されたが、脳では検出されなかった。濃度 1% 経口投与群には C-BSE 感染ウシ化マウスは認められなかった。それに対して、H-BSE では、いずれのウシ化マウスからも PrP^{BSE} は検出されなかった。すなわち、L-BSE や C-BSE が 50 mg や 5 mg の脳湿重量の経口投与でウシ化マウスへ感染したが、H-BSE は 50 mg 脳湿重量でも感染しなかった。

BSE のウシ化マウスへの経口感染を直接ルートの脳内感染と比較するために、0.02 mL の 10% 脳乳剤もしくは 10 倍階段希釈液 ($10^{-3} \sim 10^{-6}$) をウシ化マウスの脳内に投与する感染実験を行った。その結果、L-BSE は、 10^{-4} 希釈液までウシ化マウスに感染し、H-BSE と C-BSE では 10^{-5} 希釈液まで感染が成立した (表 6)。脳内ルートでは L-BSE、H-BSE、C-BSE いずれもウシ化マウスに対して高い感染性を有し、L-BSE で 2 μ g 脳湿重量、H-BSE と C-BSE は 0.2 μ g 脳湿重量で感染した。

経口投与と脳内投与での BSE の感染検出限界を比較すると、ウシ化マウスへの経口投与では、脳内投与と比べて L-BSE と C-BSE で $4.4\text{-log} (= 50 \text{ mg} : 2 \times 10^{-3} \text{ mg}, = 5 \text{ mg} : 2 \times 10^{-4} \text{ mg})$ 、H-BSE で $5.4\text{-log} (= 50 \text{ mg} : 2 \times 10^{-4} \text{ mg})$ 以上の感染性が減弱することが明らかとなった。

(2) 研究項目名：異常プリオン蛋白質の生化学的性状の比較解析

1) 個別課題名：非定型 BSE 発病ヒト化マウスでの異常プリオン蛋白質の生化学的性状解析

(松浦 裕一 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門))

BSE に感染したヒト化マウスに蓄積した L-BSE、H-BSE、C-BSE それぞれの異常プリオン蛋白質の性状を比較するために、BSE 投与後に安楽死させたヒト化マウスの脳を PK (蛋白分解酵素プロテアーゼ K) で処理した後、WB でプリオン蛋白質の PK 抵抗性コアフラグメント (PrP^{Res}) を調べた。C-BSE では、ヒト化マウス (129Met/Met・219Lys/Lys) の脳に、2 糖鎖バンド優位で無糖鎖バンドの低いパターンを示す PrP^{Res} が検出された (図 1)。C-BSE 感染ヒト化マウスの PrP^{Res} のバンドパターンは、C-BSE の特徴を保持してお

り、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) 感染のバンドパターンとも類似した。しかし、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD MM1)感染のパターンとは明らかに異なっていた。これらのことから、C-BSE のヒト化マウス (129Met/Met・219Lys/Lys) への感染により、異常プリオン蛋白質の一次構造はウシ型からヒト型アミノ酸配列となるにも関わらず、WB で検出される PrP^{Res} のバンドパターンは、vCJD と同様に C-BSE 感染牛のまま保持されることが示された。したがって、このヒト化マウスはヒトが C-BSE に感染した vCJD の病態モデルとして、あるいは、感染評価のモデルとして有用であることが示唆された。

他方、L-BSE や H-BSE 投与群では、ヒト化マウスの脳をすべて WB で調べたが、PrP^{Res} は検出されなかった。

2) 個別課題名：非定型 BSE の異常プリオン蛋白質の消化酵素液による分解性の比較検討

(宮澤 光太郎 (国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構 動物衛生研究部門))

BSE の人への感染は、胃や小腸を経由して腸管付随のパイエル板から体内に侵入するルートが考えられている。この課題では、非定型 BSE の人への感染性に影響するファクターのひとつと考えられる消化酵素のプリオン感染に及ぼす影響を調べた。L-BSE、H-BSE、C-BSE の 10%ウシ脳乳剤(5 mg 脳当量)を、pH2.0 への酸性化、人工胃液(ペプシン 0.5 mg, 0.23 mL)での 37°C1 時間の酵素消化、pH8.0 へ弱アルカリ化、胆汁(3.0 mg)を含む人工膵液(パンクレアチン 1.0 mg, 0.52 mL)での 37°C2 時間の酵素消化により順次処理した。人工消化液での処理後の材料を、人工胃液や人工膵液の酵素活性を失活させるために 100°Cで 10 分間加熱処理した後、ウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウスの脳内に 0.02 mg 牛脳湿重量当量を投与した。C-BSE では 5 頭中 5 頭のウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウスが脳内投与後、平均 327 日の潜伏期間で発病したが、L-BSE や H-BSE では脳内投与後最長 650 日まで観察したが、いずれも発症しなかった(表 7)。とりわけ、加熱処理のみの乳剤でも、L-BSE や H-BSE はウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウスに感染しなかった。

ウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウスを用いた BSE の検出限界希釈法による脳内投与実験の結果を参照すると、C-BSE では人工消化酵素処理と加熱処理、あるいは加熱処理のみのマウスの潜伏期間が、未処理の 0.02 mg 牛脳湿重量を投与したマウスよりも潜伏期間が短縮した(参考表)。これは、BSE 感染ウシ脳乳剤のロットの違いや人工消化酵素処理過程で凝集した可能性も考えられた。L-BSE や H-BSE では、すべての処理で感染性を示さなかったため、比較はできない。しかしながら、未処理の牛脳湿重量 0.00002 mg の投与で感染性が検出できなかったことから、少なくとも加熱処理のみで感染性が 1/1,000 以下に減弱したと考えられた。

一方、WB では、C-BSE、L-BSE、H-BSE いずれも人工胃液+人工膵液の

酵素処理に抵抗性の PrP が検出されたが、PK 処理はしていないにもかかわらず、それぞれ、PK 抵抗性 PrP^{Res} のバンドパターン特性と類似していた (図 2 A)。WB での PrP のシグナルをもとに分解量を算出すると、C-BSE の PrP は、未消化コントロールに比べて人工胃液で 33/38、人工胃液と人工腠液で 26/38 と僅かな減弱であった。しかしながら、L-BSE の PrP は人工胃液で 6/24、人工腠液の追加処理で 1/24 まで減少した。H-BSE でも、人工胃液と人工腠液で 1/33 に減弱した (図 2 B)。

人工消化酵素による C-BSE の感染性の減弱は認められなかったことから、C-BSE は経口ルートで感染性を保ちながら腸管まで到達することが考えられた。一方、L-BSE や H-BSE の PrP^{Res} は人工消化液処理で完全には分解されなかったが、感染性は大きく減弱することが明らかとなった。L-BSE、H-BSE は酵素未添加での酸性化やアルカリ化の処理に次いで、100°C、10 分間の熱処理の過程でも感染性が 1/1000 以下に減弱することから、熱や消化酵素に対する感受性も高いと考えられた。ヒトの消化液を模した人口消化液による PrP の減少も考え合わせると、L-BSE、H-BSE は、C-BSE と比べて酵素や温度に対する抵抗性が低いと考えられた。

(3) 研究全体の成果、考察及び結論

ヒト化マウスを用いた感染実験で、C-BSE は脳内や腹腔内ルートでヒト化マウス 129Met/Met・219Glu/Glu、129Met/Met・219Lys/Lys に感染した。感染したマウスはコドン 129 が Met/Met のみであり、ヒトプリオン蛋白質の多型が感染に影響することが示唆された。実際、C-BSE が感染したとされる変異型 CJD の患者は輸血による 1 例を除きすべてコドン 129 が Met/Met 型であり、219Lys 型の症例も 1 例で報告されている。ヒト化マウスへの感染性は C-BSE 感染における人の正常多型の影響を反映すると考えられた。一方、非定型 BSE は脳内や腹腔内投与後にいずれのヒト化マウスにも感染しなかったことから、非定型 BSE のヒトへの感染リスクは、C-BSE より小さいと考えられた。

L-BSE, H-BSE, C-BSE いずれの BSE プリオンもヒト化マウスへの経口投与では、感染しなかった。そこで、より感受性の高いウシ化マウスを用いて BSE の経口感染をおこなったが、脳内投与後の感染性と比較して 1/10,000 より低い感染効率であった。このことは、マウスにおける経口投与での感染が脳内投与と比べて感受性が低いことを示しているが、マウスの消化吸収のシステムが反芻動物の牛と異なっており、脳内と経口との感染性を一元的に論じることは適正ではないかもしれない。しかし、L-BSE は経口投与によるウシ化マウスへの感染性が C-BSE と比べて 1/10、H-BSE は 1/100 以下であることが示されたことから、非定型 BSE の牛への感染性は少なくとも従来型の BSE と比べて低いと考えられる。

C-BSE では、ヒトの消化酵素を模した人工消化液とその後の 100°C、10 分間の熱処理でプリオンの感染性が全く失われなかった。これに対して、非定型 BSE は人工消化液で PrP の減少が見られ、100°C、10 分間の熱処理が加わると感染

性は 1/1000 以下に減少したことから、非定型 BSE のプリオン (PrP^{Sc}) は C-BSE に比べて非常に不安定であることが示された。

この研究課題では、非定型 BSE のヒト化マウスへの感染リスクを C-BSE と定量的に比較することは困難であった。その原因として、非定型 BSE そのもののヒト化マウスへの感染が全く成立しなかったことによる。C-BSE もヒト化マウスへの感染が困難であったが、それでも脳内への直接感染では長い潜伏期間の後 129Met/Met・219Lys/Lys のマウスが 3/7 の感染が成立した。末梢感染ルートのひとつとして腹腔内投与実験でも 129Met/Met・219Lys/Lys、129Met/Met・219Glu/Glu マウスに感染性を示した。このことは、コドン 219 Lys/Lys とコドン 129Met/Met のプリオン蛋白質遺伝子が C-BSE の感染リスクファクターになることが実験的にも検証された。また、非定型 BSE の人に対する感染性が C-BSE に比べて低いこともヒト化マウスで明らかになった。

この研究課題で得られた重要な成果は、C-BSE の牛からヒトへの感染はヒトの遺伝子多型がリスクファクターとなりうること、非定型 BSE の人に対する感染性が C-BSE と比べて低いことを実証したことである。また、非定型 BSE プリオンは不安定で、C-BSE に比べて不活化し易いことも明らかとした。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 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
なし
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
なし
- 3 特許及び特許出願の数と概要
なし
- 4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）
なし

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

- 1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 非定型 BSE の感染とヒトの遺伝子多型との関係を明らかにする。	5	定型 BSE では感受性の高いヒトの遺伝子多型を明らかにした。しかし、非定型 BSE はいずれのヒト化マウスにも感染が成立せず、ヒトプリオン蛋白質遺伝子多型との関係も見いだせなかった。
(2) ウシ化マウスを用いて非定型 BSE のウシへの	5	BSE の経口感染リスクは脳内投与と比べて、L-BSE で 1/10,000、H-BSE で

経口感染性を明らかにする。		1/100,000、C-BSE で 1/10,000 より小さいことを示した。
(3) ヒト化マウスを用いて BSE のヒトへの経口感染を定量的に明らかにする。	4	ヒト化マウスは、5 mg の BSE ウシ脳の経口投与では寿命以内に感染しないことを明らかにした。
(4) BSE 高ばく露ヒト化マウスを用いて BSE のヒトへの経口感染を定量的に求める。	4	上記より 10 倍量 (50 mg) の BSE ウシ脳を経口投与しても、ヒト化マウスは寿命以内に感染しないことを明らかにした。
(5) 非定型 BSE 感染ヒト化マウスの PrP ^{Sc} の生化学的性状を明らかにする。	4	非定型 BSE はヒト化マウスに感染しなかったため、PrP ^{Sc} の生化学的性状解析は出来なかった。
(6) 非定型 BSE PrP ^{Sc} の人工消化液に対する抵抗性を明らかにする。	4	人工消化酵素処理により異常プリオン蛋白質が 1/10 程度減少することを示した。しかし、これが感染性に及ぼす影響について定量的解析ができなかった。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	C-BSE では、脳内投与や腹腔内投与でヒト化マウスは感染したが、非定型 BSE はいずれの投与ルートでも感染しなかったことから、非定型 BSE のヒトへの感染リスクは、C-BSE より小さいと考えられる。
(2) 研究成果の有用性	4	非定型および定型 BSE の感染リスクを定量的に評価する知見を提供できた。
<p>総合コメント</p> <p>この研究課題で得られた重要な成果は、C-BSE の牛からヒトへの感染はヒトの遺伝子多型がリスクファクターとなりうること、非定型 BSE の人に対する感染性が C-BSE と比べて低いことを実証したことである。また、非定型 BSE プリオンは不安定で、C-BSE に比べて不活化し易いことを示唆する成果も得た。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

図表

表 1 脳内投与による BSE のヒト化マウスへの感染

ヒト化マウスの 遺伝子型	L-BSE		H-BSE		C-BSE	
	感染率	最長 観察期間	感染率	最長 観察期間	感染率	最長 観察期間
129Met/Met ・219Glu/Glu	0/8	891	0/9	812	0/12	839
129Met/Val ・219Glu/Glu	0/10	891	0/5	839	0/10	839
129Val/Val ・219Glu/Glu	0/7	802	0/9	826	0/5	839
129Met/Met ・219Lys/Lys	0/6	776	0/15	802	3/7	839 (796, 824, 839)

感染率：脳にPrP^{BSE}が検出されたマウスの頭数(n)/投与頭数(n0)。

最長観察期間：PrP^{BSE}陰性マウスの投与後の最長観察日数、括弧内赤字はPrP^{BSE}陽性マウスの投与後日数。

表 2 FDC バイオアッセイによる BSE のヒト化マウスへの感染

ヒト化マウスの 遺伝子型	腹腔内投与150日後の脾臓でのPrP ^{BSE} の検出率 (n/n0)		
	L-BSE	H-BSE	C-BSE
129Met/Met ・219Glu/Glu	0/10	0/9	3/8
129Met/Val ・219Glu/Glu	0/10	0/9	0/11
129Val/Val ・219Glu/Glu	0/8	0/9	0/8
129Met/Met ・219Lys/Lys	0/10	0/8	10/10

表 3 BSE ウシ脳 10%乳剤の経口投与による BSE のヒト化マウスへの感染

ウシ脳	ヒト化マウス 遺伝子型	投与数	PrP ^{BSE} の検出率		感染個体数	最長観察期間 (days)
			脳 (n/n0)	脾臓 (n/n0)		
L-BSE	129Met/Met -219Glu/Glu	8	0/8	0/3	0	759
	129Met/Val -219Glu/Glu	10	0/10	0/3	0	860
	129Val/Val -219Glu/Glu	9	0/9	0/2	0	850
	129Met/Met -219Lys/Lys	8	0/7	0/6	0	851
H-BSE	129Met/Met -219Glu/Glu	8	0/8	0/7	0	686
	129Met/Val -219Glu/Glu	9	0/9	0/7	0	853
	129Val/Val -219Glu/Glu	11	0/11	0/10	0	811
	129Met/Met -219Lys/Lys	9	0/9	0/3	0	854
C-BSE	129Met/Met -219Glu/Glu	9	0/9	0/6	0	811
	129Met/Val -219Glu/Glu	10	0/10	0/4	0	850
	129Val/Val -219Glu/Glu	10	0/10	0/6	0	855
	129Met/Met -219Lys/Lys	10	0/10	0/4	0	850

n/n0 : PrP^{BSE}が検出されたマウスの頭数/試験頭数。

表 4 BSE ウシ脳マセレートを経口投与による BSE のヒト化マウスへの感染

ウシ脳	ヒト化マウス 遺伝子型	投与数	PrP ^{BSE} の検出率		感染個体数	最長観察期間 (days)
			脳 (n/n0)	脾臓 (n/n0)		
L-BSE	129Met/Met -219Glu/Glu	9	0/9	0/3	0	860
	129Met/Val -219Glu/Glu	7	0/7	0/3	0	860
	129Val/Val -219Glu/Glu	8	0/8	0/6	0	854
	129Met/Met -219Lys/Lys	13	0/13	0/5	0	853
H-BSE	129Met/Met -219Glu/Glu	10	0/10	0/6	0	860
	129Met/Val -219Glu/Glu	9	0/9	0/6	0	860
	129Val/Val -219Glu/Glu	8	0/8	0/3	0	831
	129Met/Met -219Lys/Lys	10	0/10	0/5	0	862
C-BSE	129Met/Met -219Glu/Glu	9	0/9	0/6	0	860
	129Met/Val -219Glu/Glu	13	0/13	0/6	0	860
	129Val/Val -219Glu/Glu	8	0/8	0/4	0	844
	129Met/Met -219Lys/Lys	14	0/14	0/8	0	854

n/n0 : PrP^{BSE}が検出されたマウスの頭数/試験頭数。

表 5 経口投与による BSE プリオンのウシ化マウスへの感染

ウシ脳	濃度	投与数	PrP ^{BSE} の検出率		感染個体		最長観察期間 (days)
			脳 (n/n0)	脾臓 (n/n0)	数	潜伏期間 (days)	
L-BSE	100%	9	0/9	1/5	1	853	855
	10%	7	0/7	0/4	0		804
	1%	3	0/3		0		754
	>1%	6	0/6	0/1	0		845
H-BSE	100%	10	0/10	0/3	0		856
	10%	9	0/9	0/5	0		808
	1%	5	0/5	0/1	0		798
	>1%	8	0/8	0/4	0		856
C-BSE	100%	9	2/9	0/1	2	763, 809	851
	10%	8	0/8	1/6	1	770	800
	1%	4	0/4		0		705
	>1%	10	0/10	0/3	0		851

n/n0 : PrP^{BSE}が検出されたマウスの頭数/試験頭数。

表 6 BSE ウシ脳の検出限界希釈法におけるウシ化マウスの感染率と潜伏期間

希釈倍率 (log ₁₀)	L-BSE		H-BSE		C-BSE	
	感染率	潜伏期間	感染率	潜伏期間	感染率	潜伏期間
-1 *	12/12	663 ± 143	6/6	719 ± 46	15/15	596 ± 81
-3	9/9	732 ± 82	4/4	669 ± 167	5/5	774 ± 65
-4	3/9	721, 756, 827	3/3	714 ± 156	5/5	736 ± 95
-5	0/9	(864)	2/3	586, 804	1/4	812
-6	0/10	(864)	0/4	(739)	0/5	(812)

感染率: 脳にPrP^{BSE}が検出されたマウスの頭数/投与頭数。

潜伏期間: BSE感染陽性マウスの投与後日数を用いて平均と標準偏差(mean days ± S.D.)を算出。ただし、すべて陰性の場合には最長観察日数を“(n)”で表記。

* 10%ウシ脳乳剤脳内投与量(0.02mL)はウシ脳湿重量 2 mg に相当。

表 7 人工消化液処理後の BSE の感染性

ウシ脳乳剤	処理	投与数	BSE感染マウス数 (潜伏期間,日数)	生存マウス数 (最長観察日数)
L-BSE	人工消化酵素+加熱	6	0	6 (650)
L-BSE	加熱	5	0	5 (523)
H-BSE	人工消化酵素+加熱	6	0	6 (650)
H-BSE	加熱	5	0	5 (587)
C-BSE	人工消化酵素+加熱	5	5 (327)	0
C-BSE	加熱	5	5 (325)	0
非感染	人工消化酵素+加熱	6	0	6 (650)

人工消化酵素: ペプシンを含む酸性溶液と膵液を模したパンクレアチンと胆汁を含むアルカリ溶液による順次処理した。

加熱: 100°C10分間の処理

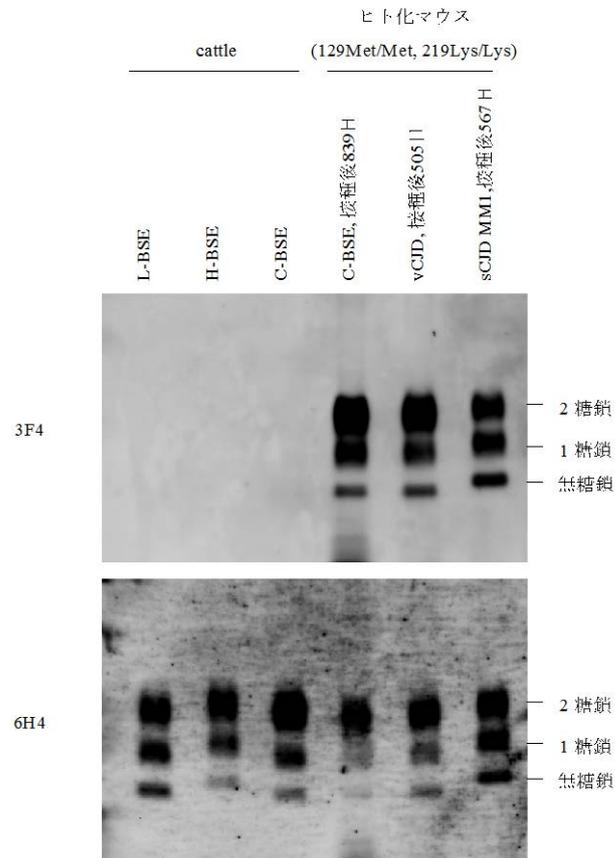
参考 表 検出限界希釈法によるウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウスへの感染

牛脳湿重量	L-BSE		H-BSE		C-BSE	
	感染率	潜伏期間	感染率	潜伏期間	感染率	潜伏期間
0.02 mg	5/5	336 ± 39	9/9	454 ± 48	5/5	377 ± 54
0.002 mg	5/5	500 ± 106	9/9	591 ± 84	5/5	417 ± 60
0.0002 mg	1/4	363	8/10	656 ± 20	2/5	421, 554
0.00002 mg	0/5	(818)	0/5	(802)	0/5	(769)

感染率: 脳にPrP^{BSE}が検出されたマウスの頭数/投与頭数。

潜伏期間: BSE感染陽性マウスの投与後日数を用いて平均と標準偏差(mean days ± S.D.)を算出。ただし、すべて陰性の場合は最長観察日数を“(n)”で表記。

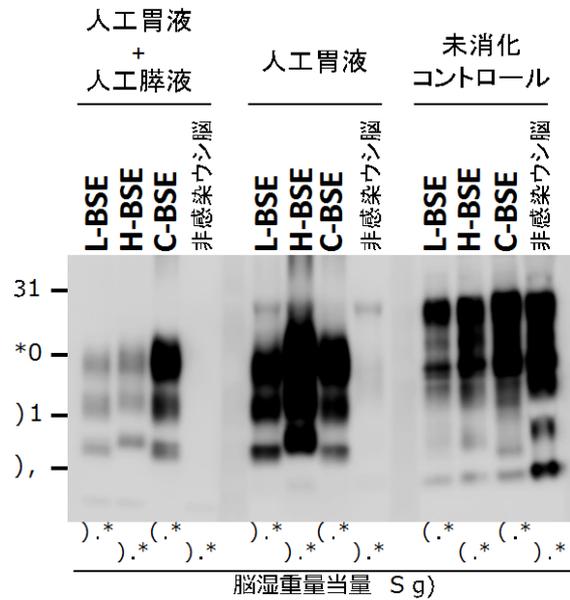
図1 ウシとヒト化マウスの脳を用いたウエスタンブロット解析



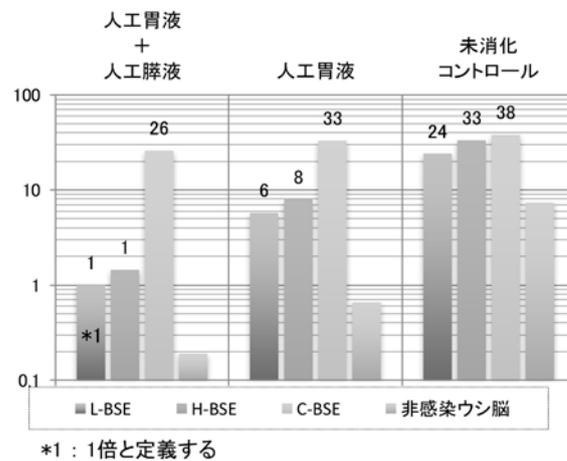
L-BSE、H-BSEもしくはC-BSEに感染したウシとヒト化マウスの脳乳剤から蛋白質分解酵素 (PK) 抵抗性の異常プリオン蛋白質を抽出して、蛋白質を電気泳動で分画した後電氣的に膜に転写した。ヒト型と反応する抗体 (3F4) もしくはウシ型とヒト型と反応する抗体 (6H4) で異常プリオン蛋白質を検出した。バンドパターンの対象として、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) と孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD MM1) に感染したヒト化マウスの脳を同時に泳動した。

図2 BSEウシ脳乳剤における人工消化液抵抗性のPrPの検出

(A) WBによる人工消化酵素抵抗性PrPの検出



(B) 人工消化酵素によるPrPの分解量(相対量)



(A) L-BSE、H-BSEもしくはC-BSEのウシ脳乳剤を人工酵素液で消化した後、電気泳動で蛋白質を分画し、電気的に膜に転写した。抗プリオン抗体でプリオン蛋白質を検出した。(B) WBでの見られたプリオン蛋白質バンドの濃さを指標に、PrPの分解量を相対的に算出した。