

7. 異常型プリオンタンパク質の生化学的検出

—我が国5頭目のBSE陽性牛の異常型プリオンの組織分布—

分担研究者 山河芳夫 国立感染症研究所細胞化学部室長

研究要旨 厚生労働省により実施されている牛の全頭検査において、BSEに罹患していることが確認された牛（神奈川検体、H14.8月）の組織を用いて異常型プリオンタンパク質(PrP^{sc})の生体内分布についてウエスタンブロット法を用いて詳細に検討した。その結果、特定危険部位とされている中枢神経系（脳、脊髄）、回腸遠位部及び、脊髄に接する神経節のうち、頸神経節、胸（6-7）神経節、腰神経節及び前殿神経節にPrP^{sc}の蓄積を認めたと、肩甲上神経、脛神経及び尾神経では検出限界以下であった。一方、各所のリンパ節、脾臓、扁桃及びその他の実質臓器（舌、小腸、心、肺、胃、膵臓、肝臓、骨髄、子宮、その他）にはPrP^{sc}の蓄積を認めることは出来なかった。

A. 研究目的

BSEの確定診断に用いられているウエスタンブロット法(WB法)を用いて、BSE罹患牛におけるPrP^{sc}の組織分布を明らかにし、マウスのバイオアッセイ法を用いて欧州委員会が定めた牛の危険部位に関する知見との整合性を検討するとともに、脳試料の分析を目的として策定された現行のウエスタンブロット法の改良を試みる。

B. 研究方法

試料の調整：食肉検査所において採取された各部の試料約200mgから検査プロトコルに準拠して20%乳剤を調整した。乳剤は安井機械のマルチピースショッカー、ニッカトー製の直径1mmのタングステンピース(200mg)を用いて2000rpm回転、5分の処理で調整した。但し、リンパ節、骨髄などの硬い組織については、直径1.5mmのピースで10分間乳化処理を行なった。

酵素消化：組織乳剤は検査プロトコルに従って、コラーゲナーゼ、プロテイナーゼK(PK)及びDnase Iで順次消化した。なお、消化に先立って、反応液に5%の2-Butanolを加えて超音波処理をしておくことPrP^{sc}の同定の妨げとなるPrP^cの切れ残りを減らすことができる。

電気泳動/WB：概ね、検査プロトコルに準

拠して行なったが、検査時間の効率化を検討する目的でDRC社の8x4cmゲルも併せて用いた。この場合、SDS-電気泳動を400V、プロテイングを40Vでそれぞれ行なうことができるので標準プロトコルでこれらのステップに要する時間(2時間)を30分に短縮することができる。

抗体：1次抗体(抗プリオン抗体)は帯広畜産大学で作成したモノクローン抗体44B1(マウス)を主に使用したが、ペプチド抗体B103(ウサギ;ポリクローナル)も併用した。なお、何れの抗体も1μg/ml濃度で使用した。

定量：ECL発色フィルムをスキャナーで取り込み、画像をNIH-Imageソフトウェアで数値化、定量した。このとき、同時に泳動、発色させたマウスプリオンタンパクの発色の程度を比較することにより、ゲル間のバラツキを補正した。

C. 結果

1.延髄門部におけるPrP^{sc}の分布：図-1に神奈川陽性牛のWB法による確定検査の結果を示す。食肉衛生検査所から送付された1次検査(エライザ)用の延髄門部の試料と当研究所で新たに切り出した試料ではPrP^{sc}の含量に大きな違いが認められた。

即ち、前者には少なくとも後者の250倍のPrP^{sc}が存在していた。このことを確認するため

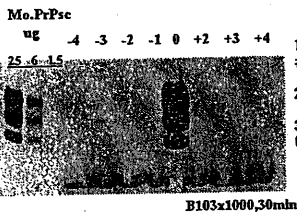
図-1 神奈川検体の2次検査



1. moPrPsc 25ug eq.
 2. moPrPsc 6ug eq.
 3. moPrPsc 1.5ug eq.
 4. NIID 10mg eq.
 5. NIID 2.5mg eq.
 6. NIID 0.6mg eq.
 7. NIID 0.15mg eq.
 8. Elisa 10mg
 9. Elisa 2.5mg
 10. Elisa 0.6mg
 11. Elisa 0.15mg
 12. Elisa 0.04mg
- 44B1x10000

に、送付された延髄部分を5mm間隔で全て切り出し、PrP^{Sc}の分布を調べた。その結果、神奈川陽性牛の延髄ではPrP^{Sc}が存在しているのは1次検査様に切り出された門部の極めて狭い範囲に限られていることが判った(図-2)。

図-2 神奈川陽性検体の延髄試料



- Mo.PrPsc
ug 4 -3 -2 -1 0 +2 +3 +4
1. 門部を0とし、+脳組 -背髄方向各切片は15-7mm
 2. +1は検査で使用済み(前のページ)
 3. 0位(エライザ検体)は800ug、その他は20ug組織等を添加
- B103x1000,30min

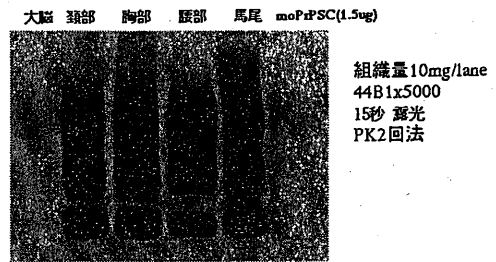
データには示さないが、現在検討中の和歌山陽性牛ではPrP^{Sc}は神奈川陽性牛に認められるような切り出し位置による極端な変動は認められなかった。上記の結果は一次検査用のサンプリングは延髄門部から正確に切り出すことの重要性を示している。

2. 脊髄及び神経節におけるPrP^{Sc}の分布: 頸部、胸部、腰部及び馬尾の4ヶ所を脊髄試料として調べたが、脊髄の何れの部位でもPrP^{Sc}の強い蓄積を認めた(図3)。

脊髄に連続する神経節として、頸、胸(6-7)、腰、前殿、肩甲上、脛及び尾神経を調べた。その結果、頸、胸(6-7)、腰神経節には中程度、前殿神経節にはPrP^{Sc}の弱い蓄積がそれぞれ認められたが、肩甲上、脛及び尾の神経節にはPrP^{Sc}の蓄積は認められなかった(図-4)。

3. 脳におけるPrP^{Sc}の分布: 神奈川陽性牛の脳は、と畜後室温に数日間放置されていたために、殆ど自己融解しており詳しい解析を行なうことは出来なかった。小脳は比較的保存状態が良好であったので白質、灰白質に別けて解析することが可能であった(図-3)。小脳には白質、

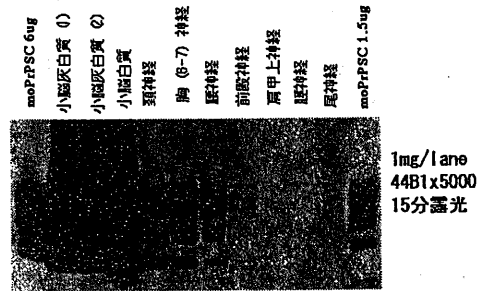
図-3 神奈川県陽性検体 脊髄のWB



組織量10mg/lane
44B1x5000
15秒露光
PK2回法

灰白質を問わず多量のPrP^{Sc}の蓄積があるが、今回、大脳試料として採取出来た部位(前頭葉、及び頭頂葉周辺と思われる)への蓄積はそれほど多量であると考えられない。(図-4)。

図-4 神奈川陽性牛小脳および神経(節)のWB



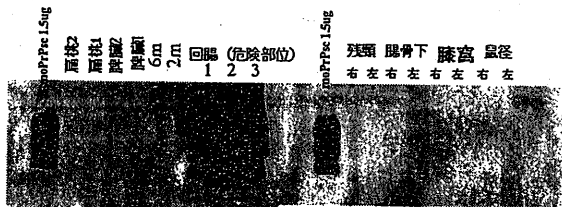
1mg/lane
44B1x5000
15分露光

4. リンパ組織、リンパ節及び回腸遠位部におけるPrP^{Sc}の分布:

図-5に示す様に駆幹リンパ節、リンパ組織(脾臓、扁桃)にはPrP^{Sc}の蓄積が認められなかった。図には示さないが、耳下腺、腸間膜、腎などの臓器リンパ節にもPrP^{Sc}の蓄積が認められない。一方、特定危険部位である回腸遠位部ではパイエル板を切り出した部位に中程度の蓄積が認められるが、危険部位から2m、6m前方ではPrP^{Sc}を認めなかった。消化器管として、舌、食道、胃(1-4胃)、十二指腸、空腸、盲腸、

結腸及び直腸を分析したが何れの臓器にも PrP^{Sc} を認めることは出来なかった。その他、実質臓器として、心、肺、膀胱、卵巣子宮、乳房及び副腎にも PrP^{Sc} の蓄積が認められなかった。

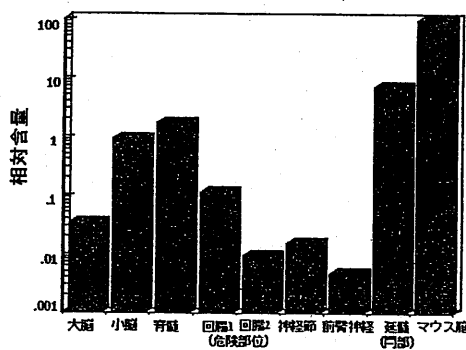
図-5 神奈川陽性検体リンパ節



5. 陽性部位における PrP^{Sc} の蓄積量の比較 :

図-6 に WB 法で陽性となった部位における PrP^{Sc} の相対含量を示した。数値は、発症マウス脳で認められた PrP^{Sc} で normalize したものである。陽性となった部位では延髄門部に最も強い PrP^{Sc} の蓄積があり、以下>脊髄=小脳>回腸=大脳>神経節の順で蓄積量は低下していた。最も蓄積量が多い延髄門部と少ない前脚神経では単位重量当たり、PrP^{Sc} の蓄積に 1000 倍の違いがあった。

図-6 神奈川陽性検体における PrP^{Sc} の分布



D/E. 考察/結論

現在まで我が国で7頭の BSE 罹患牛が発見されているが、神奈川 (H14. 8 月)、和歌山 (H. 15 年 1 月) の 2 例を除き検査に用いた延髄の一部が残っているのみである。本研究で用いた神奈川検体は大脳が自己融解していたが、ほぼ全ての臓器が採取することが出来た貴重な例である。

延髄は採取のし易いことや BSE 病原体を初

期から検出できることから、検査部位として最適であるが、本例に見る様に病原体の分布は延髄門部にかなり局限されて蓄積されている場合があるので検査の正確性を期するためにはサンプリング部位に十分な注意が払われねばならない。

BSE 病原体は中枢神経及び神経節にのみ局在するが、唯一、回腸のみが非神経組織として病原体を蓄積していた。本研究班の佐多は回腸において病原体が蓄積しているのはアウエルバッハ神経叢の神経細胞であることを免疫組織染色で明らかにしており、このことは経口接種された BSE 病原体が中枢神経に侵入する経路を明らかにする上で興味深い。

BSE はスクレーピーと異なり脾臓などのリンパ系組織には蓄積しないと考えられているが、本研究でもそのことを裏付けた。しかし、スクレーピーでは脾臓、扁桃等のリンパ系組織に PrP^{Sc} が蓄積することや vCJD で病原体が扁桃に検出されていることを考え合わせると、リンパ系組織についてはさらに検討を要するものと思われる。