

日本における牛海綿状脳症(BSE)の研究

平成28年5月11日(水) 於 日本学術会議講堂

毛利 資郎

東北大学 客員教授

1

本日の内容

1. わが国のBSEの現況
2. 疫学研究
3. プリオンの体内動態
4. BSEプリオンの試験管内増殖法(PMCA)と不活化
5. 非定型BSEの研究
6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

2

1. わが国のBSEの現況

2. 疫学研究

3. プリオンの体内動態

4. BSEプリオンの試験管内増殖法(PMCA)と不活化

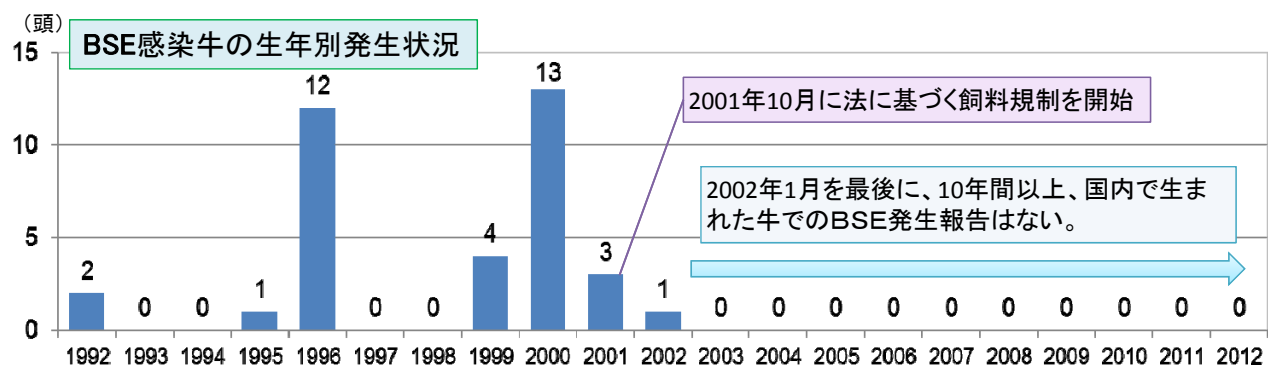
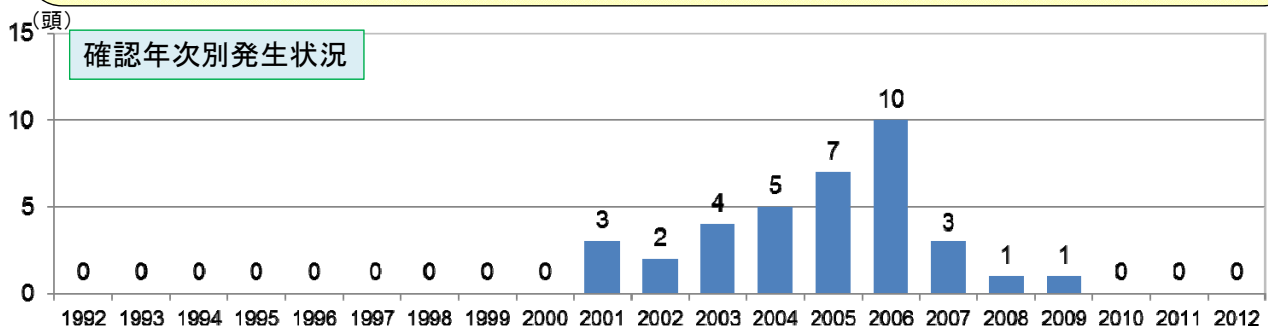
5. 非定型BSEの研究

6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

3

日本におけるBSEの発生状況

- 2001(平成13)年9月に初めてBSEが確認。現在までに、と畜検査で22頭、死亡牛検査で14頭(計36頭)の発生を確認。
- BSE感染牛を出生年別にみると、1996(平成8)年生まれが12頭、2000(平成12)年生まれが13頭と多くなっている。
- 8例目及び24例目は、検出された異常プリオン蛋白質の性状が定型的なものと異なるとされている。
- 飼料規制の実施直後に出生した牛(2002(平成14)年1月生)以降に生まれた牛での発生はない。



1. わが国のBSEの現況

2. 疫学研究

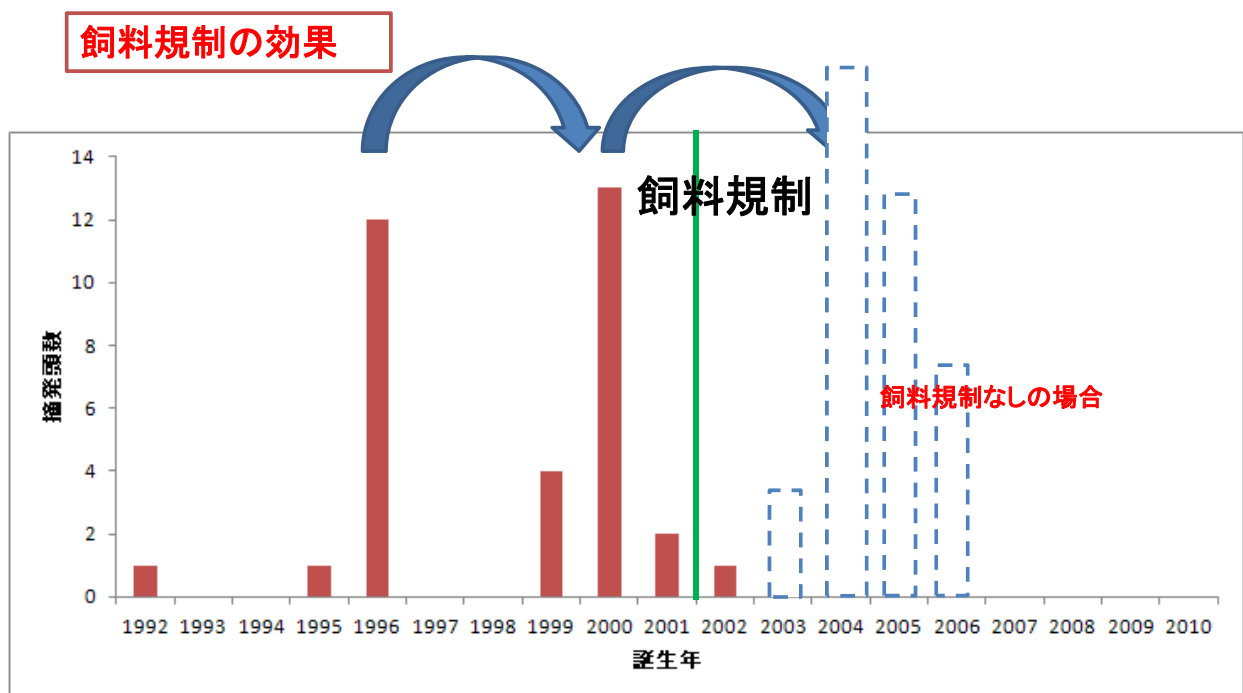
3. プリオンの体内動態

4. BSEプリオンの試験管内増殖法(PMCA)と不活化

5. 非定型BSEの研究

6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

出生年別BSE発生状況



2001年9月から2006年12月にかけて北海道(日本)で生まれたウシに関するBSE疫学

Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in cattle in Hokkaido, Japan, between September 2001 and December 2006

M. KADOHIRA, M. A. STEVENSON, T. KANAYAMA, R. S. MORRIS

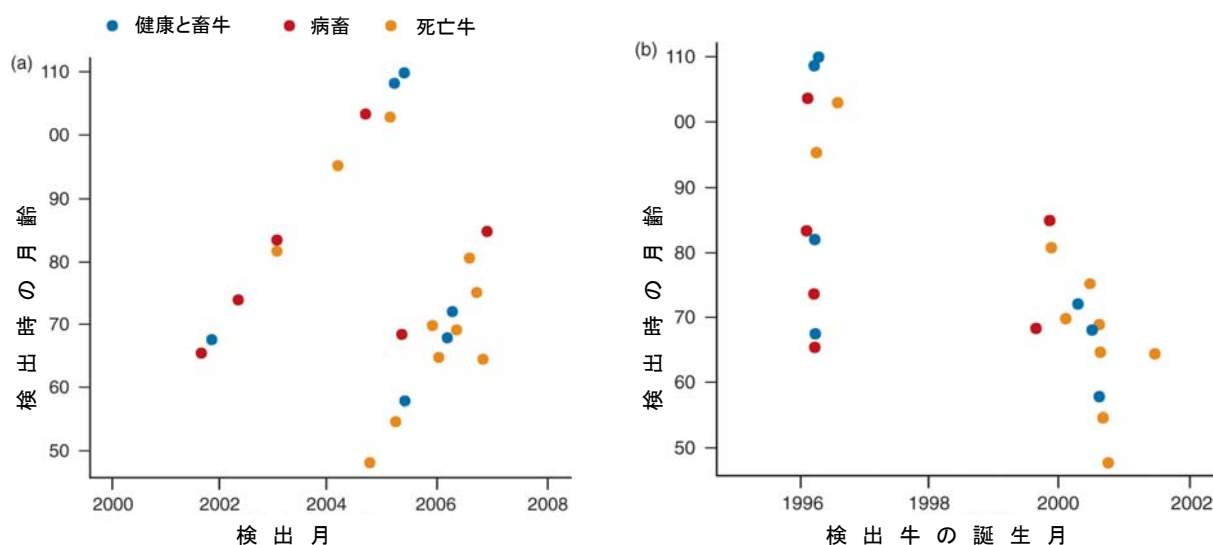
Veterinary Record 163:709-713, 2008

日本では、2001年9月から2006年12月にかけて、のべ600万頭のウシについてBSE検査を実施し、うち31頭が陽性であった。北海道での陽性ケースを調べたところ、**二つのコホート(1996年の7ヶ月間に生まれた集団と1999年から2000年にかけて生まれた集団)**が陽性となっていた。1996年生まれの子牛の産地は北海道東部に集中していたが、それ以外の産地は北海道全域に散在していた。このことは汚染されたエサが1996年に一カ所で混入・供給された後、1999年以降に国内曝露・再循環が起きたことを間接的に示すものだとしている。

7

北海道に於けるBSEと診断されたウシの検出時の月齢と生誕年の関係

2001—2006年

M. Kadohira et al. *Veterinary Record* 2008;163:709-713

1. わが国のBSEの現況
2. 疫学研究
3. プリオンの体内動態
4. BSEプリオンの試験管内増殖法(PMCA)と不活化
5. 非定型BSEの研究
6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

ウシ海綿状脳症(実験)感染牛における末梢神経のプリオン

Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle

Kentaro Masujin,¹ Danny Matthews,² Gerald A. H. Wells,² Shirou Mohri¹ and Takashi Yokoyama¹

¹Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

²Veterinary Laboratories Agency (VLA), Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK

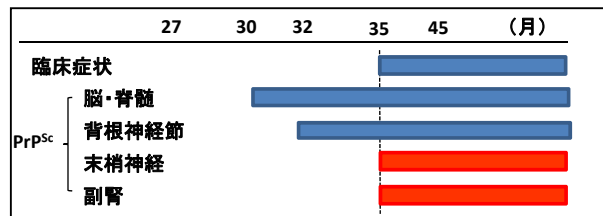
Journal of General Virology (2007), **88**, 1850–1858

牛海綿状脳症(BSE)経口実験感染牛より経時的に採材された組織について異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の蓄積の有無を調べた。末梢神経および副腎におけるPrP^{Sc}の蓄積は、脳におけるPrP^{Sc}の蓄積時期と同時に、あるいは遅れて認められる。(動衛研HPより)
C-BSE脳内接種牛のプリオン分布は脳および末梢神経にみとめられたが、プリオンは副腎にも存在した。羊のスクレイピーでは、末梢神経から中枢神経への感染がすでに報告されているが、ウシでは未知である。そこで、BSE感染牛の末梢神経にも感染性があるのか、腸から中枢神経への病原体伝播仮説以外に末梢神経が関与した感染が存在するかどうかを確認した。その結果、BSE感染牛では、ウェスタンブロット法により、PrP^{Sc}が中枢神経と背根神経節に、それから末梢神経幹と副腎に確認できた。しかし、このBSE非感染牛では末梢神経系にPrP^{Sc}は確認できなかった。このことから、PrP^{Sc}は、中枢神経で検出でき、病気進行と同時にあるいはそれより遅れて末梢神経にも蓄積することが明らかになった。

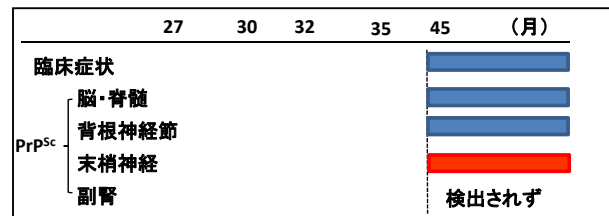
BSE実験感染牛の経時的解析（英国経口接種材料）日本 NIAH

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^{Sc}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）
- **末梢神経の中でも迷走神経、内臓神経はプリオンの移動経路としてより重要である**と考える

Masujin et al., (2007) Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. J. Gen. Virol. 88: 1850-1858.

11

ウシ海綿状脳症病原体を経口投与したウシにおけるパイエル板を含む小腸後部においての病気と関連したプリオン蛋白質(PrP^{Sc})の検出

Detection of Disease-Associated Prion Protein in the Posterior Portion of the Small Intestine Involving the Continuous Peyer's Patch in Cattle Orally Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy Agent.

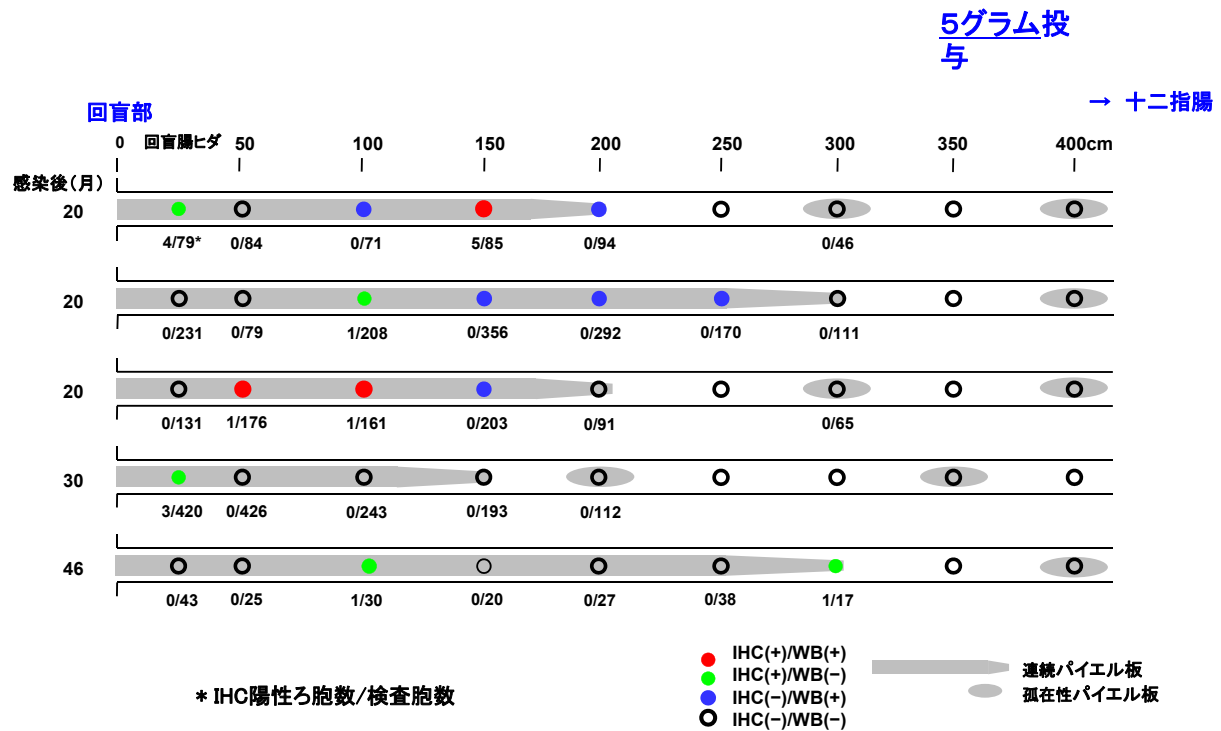
Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Murayama, Y., Mohri, S. and Yokoyama, T. (2011),

Transboundary and Emerging Diseases, 58: 333–343. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01208.x

24頭の子牛を、牛海綿状脳症(BSE)原因物質であることが確認されている脳幹ホモジネート5gに暴露した。接種後20カ月(MPI)の死後解析を行うため、2～5頭を6カ月または12カ月の間隔で逐次と殺した。BSE原因物質を経口投与された牛から採取した標本を、ウェスタンブロット法と免疫組織化学的分析により検査した。免疫標識された疾患関連プリオンタンパク質(PrP^{Sc})は、回腸全体と空腸後部を含む小腸後部から採取された連続したパイエル板中の濾胞のごく一部から検出されたが、接種後20カ月、36カ月、および46カ月の前臨床動物の残りの空腸中の不連続なパイエル板からは検出されなかった。PrP^{Sc}陽性細胞は、二重免疫蛍光標識法による可染体マクロファージと一致した。また、PrP^{Sc}は、接種後34カ月時点で14頭中7頭の中枢神経系(CNS)に蓄積され、そのうちの5頭は臨床兆候を発現し、接種後34カ月、46カ月、58カ月、および66カ月目にと殺された。接種後36カ月目と48カ月目にと殺された2頭の前臨床動物には、迷走神経背側運動核、延髄門部の三叉脊髄核、および／または脊髄の第13胸節の中間外側核に、最も初期かつ最小の検出可能な免疫標識PrP^{Sc}沈着が見られた。逐次と殺の結果、ウェスタンブロット法と免疫組織化学的分析では、接種後30カ月までは、延髄門部を含めCNS中にはPrP^{Sc}は検出されなかった。これらの試験結果は、BSEの病因を理解するために重要である。

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

13

発症前のBSE感染牛の感染性は空腸、回腸、回盲口で検出される

Hoffmann et al. Veterinary Research 2011, 42:21
http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/21



VETERINARY RESEARCH

RESEARCH

Open Access

BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle

Christine Hoffmann¹, Martin Eiden¹, Martin Kaatz¹, Markus Keller¹, Ute Ziegler¹, Ron Rogers², Bob Hills³, Anne Balkema-Buschmann¹, Lucien van Keulen⁴, Jorg G Jacobs⁴, Martin H Groschup^{1*}

In summary our study shows that nearly all of the BSE-infected cattle that were examined had BSE infectivity and/or detectable amounts of PrP^{Sc} in their small intestines. The highest amounts of BSE infectivity and/or PrP^{Sc} were seen in the ileum and ileocaecal junction with lower amounts in the jejunum. Clear time-dependent variations in the detectable amounts of PrP^{Sc} were visible. Younger cattle killed 8 mpi to 12 mpi carried higher PrP^{Sc} levels and had a more widespread distribution of PrP^{Sc} than animals at 16 mpi to 20 mpi. The data from this study show a more widespread distribution of the BSE agent in the small intestines in particular of pre-clinical cattle and are the first describing infectivity in jejunal samples of cattle. Therefore the data presented here are important for the definition of SRM and the implementation of their removal as part of functional public health protection measures against BSE.

論文要点

- 100 gの経口投与で臨床症状は28ヶ月までは認められず、32ヶ月で認められた。
- 英国のピーク時の経口摂取量は、潜伏期間から100mgから1gと推定されている。実験的にはBSE牛は53ヶ月から発症。
- Distal ileum をSRMと決めた当時の論文はIHCのみで検出しており、感度が低かったと考える。
- 少なくとも12ヶ月齢までの若い牛では空腸もBSEの感染性を有している。
- この研究では25m〜30mもある空腸の一部(40箇所までのパリエル板)しか検査していないことが強調されている。

14

Table 2 Overview and comparison of the results obtained by the different methods used (clear positive results are marked)

M.p.i.	Cow	Jejunum (localization A+B)				Ileum				Ileocaecal junction			
		IDEXX	PTA	IHC	Bioassay	IDEXX	PTA	IHC	Bioassay	IDEXX	PTA	IHC	Bioassay
4 (n = 2)	IT 19	-	-	-	n.d.	-	-	+	n.d.	-	-	-	n.d.
	IT 45	-	-	-	n.d.	-	-	+	n.d.	inconcl	-	-	n.d.
8 (n = 4)	IT 14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	IT 20	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	IT 39*	inconcl	inconcl	-	+	inconcl	+	+	+	-	-	-	-
	IT 55	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
12 (n = 4)	IT 01	-	-	-	+	+	+	+	+	inconcl	+	-	+
	IT 16	-	-	-	-	inconcl	inconcl	+	+	-	inconcl	-	+
	IT 06	-	-	-	+	inconcl	+	+	+	-	inconcl	+	+
	IT 57	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 (n = 4)	IT 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IT 28	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	IT 46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IT 65	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
20 (n = 4)	IT 10	-	-	-	+	-	-	-	-	inconcl	-	-	-
	IT 17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	IT 50	-	-	-	-	-	-	+	+	inconcl	-	-	-
	IT 60	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
24 (n = 4)	IT 26	-	-	-	n.d.	-	-	+	n.d.	-	-	-	n.d.
	IT 24	-	-	-	n.d.	-	-	+	n.d.	-	-	-	n.d.
	IT 47	-	inconcl	-	n.d.	-	-	+	n.d.	-	-	-	n.d.
	IT 58	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	+	n.d.

n.d.: not done, +: clear positive result, -: negative result, inconcl: inconclusive, *: both jejunal samples of the IT 39 had inconclusive reaction patterns but positive bioassay is from localization A only.

- 空腸では16ヶ月で一旦検出できなくなる
- IHCでは、数多くの箇所を検査しているためにBioassay(-),IHC(+)もある
- いずれにせよごく少量の異常なプリオン蛋白質が蓄積していると考えられる

C-BSEプリオンが消化管から末梢神経を經由して脳にいたる経路

Spread of Classic BSE Prions from the Gut via the Peripheral Nervous System to the Brain

Martin Kaatz, Christine Fast, Ute Ziegler, Anne Balkema-Buschmann, Bärbel Hammerschmidt, Markus Keller, Anja Oelschlegel, Leila McIntyre, Martin H. Groschup

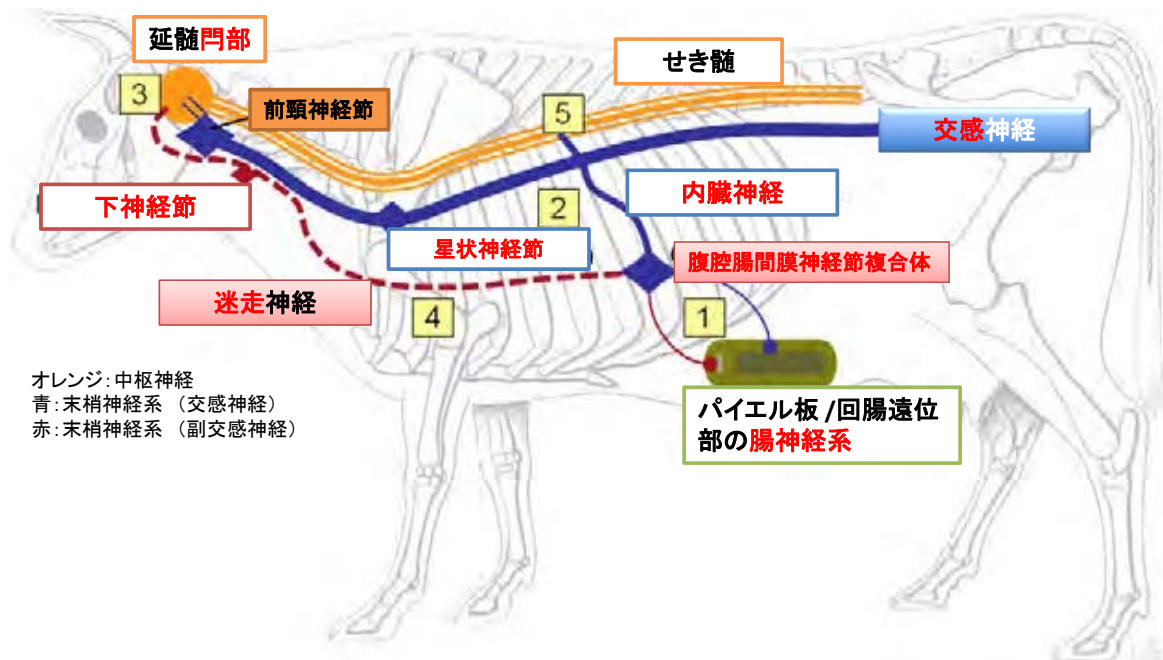
The American Journal of Pathology, Volume 181, Issue 2, 2012, 515–524

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.05.001>

経口感染実験で接種後16ヶ月から44ヶ月で経時的安楽死を行いIHCでPrP^{Sc}を検出した。16ヶ月以降交感神経系で、20ヶ月以降副交感神経系からプリオンPrP^{Sc}が検出された。脳幹からはTgbov XVマウスによる感染性が24ヶ月から認められたが、PrP^{Sc}の沈着は28ヶ月で初めて検出された。これらの結果、潜伏期間の半分の時期にBSEプリオンは自律神経系を通して求心性に中枢神経系に広がると解析される。

経口投与後予想されるプリオンの伝達経路

日本での研究結果も2012年のドイツの体内動態経路とは矛盾していない



Kaatz M. et al. Spread of Classic BSE Prions from the Gut via the Peripheral Nervous System to the Brain. *A.J.P.*, Vol. 181, No. 2, August 2012

17

1. わが国のBSEの現況

2. 疫学研究

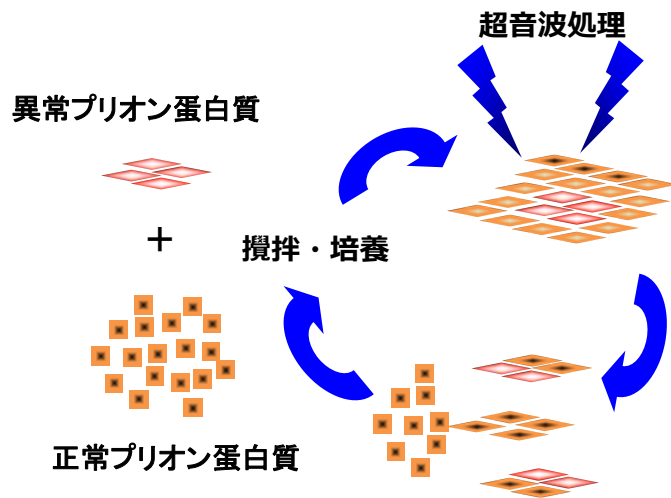
3. プリオンの体内動態

4. BSEプリオンの試験管内増殖法(PMCA)と不活化

5. 非定型BSEの研究

6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

試験管内で異常プリオンたん白質を増殖



超音波処理-攪拌培養を繰り返すこと
によって、異常プリオン蛋白質
を試験管内で増幅する

動衛研、村山原図

19

デキストラン硫酸はBSEプリオンの試験管内増幅効果を高め
ウシBSEプリオンを超高感度検出を可能とする

OPEN ACCESS Freely available online

October 2010 | Volume 5 | Issue 10 | e13152

PLoS one

Sulfated Dextrans Enhance *In Vitro* Amplification of Bovine Spongiform Encephalopathy PrP^{Sc} and Enable Ultrasensitive Detection of Bovine PrP^{Sc}

Yuichi Murayama^{1*}, Miyako Yoshioka^{1,2}, Kentaro Masujin¹, Hiroyuki Okada¹, Yoshifumi Iwamaru¹, Morikazu Imamura¹, Yuichi Matsuura¹, Shigeo Fukuda³, Sadao Onoe³, Takashi Yokoyama¹, Shirou Mohri¹

¹ Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan, ² Safety Research Team, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan, ³ Hokkaido Animal Research Center, Shintoku, Japan

これまでうまくいかなかったPMCA法によるBSEプリオンの増殖は、デキストラン硫酸を加えることにより増殖効果が高くなり、ウシBSEプリオンを超高感度に検出することが可能となった。これにより、BSE感染牛(発症牛)のだ液、口蓋扁桃、リンパ節、回盲領域、筋肉からもBSEプリオンの増殖が可能となった。

PMCA法によるBSEプリオンの検出感度

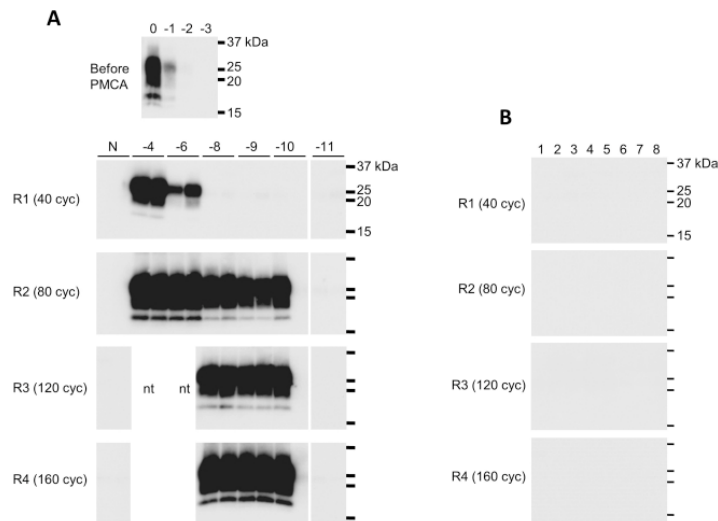
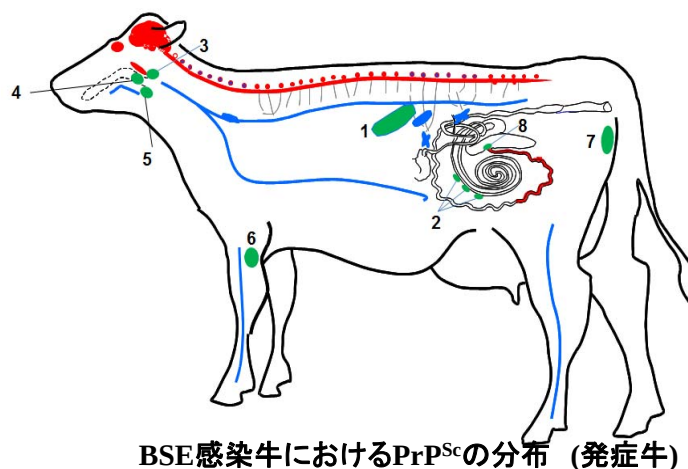


Figure 4. BSE-PrP^{Sc} detection sensitivity. **A.** The PrP^{Sc} seed was diluted to 10^{-4} to 10^{-11} with PrP^C substrate, and samples were serially amplified in the presence of 0.5% potassium dextran sulfate (DSP). The duplicate amplified samples were analyzed after each round of amplification (R1–R4) by WB after PK digestion. **B.** No spontaneous generation of PrP^{Sc} was observed. Samples labeled “1” to “8” contained only PrP^C substrate and were amplified in the presence of 0.5% DSP.
doi:10.1371/journal.pone.0013152.g004

* 脳組織の乳剤を 10^{-10} まで希釈しても検出可能となった

BSE感染牛において従前の方法では検出できなかった組織でもPrP^{Sc}が検出された



BSE感染牛におけるPrP^{Sc}の分布 (発症牛)

赤: SRM,

青: ウェスタンブロットで検出可能な組織

緑: PMCAで検出可能となった組織

1: 脾臓, 2: 腸管附属リンパ, 3: 後咽頭リンパ節, 4: 舌根リンパ, 5: だ液腺, 6: 上腕三頭筋,

7: 半腱様筋, 8: 回盲部

蒸製不活化によるBSEの定量的解析

Biochemical and Biophysical Research Communications 432 (2013) 86–91



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy

Yuichi Matsuura^a, Yukiko Ishikawa^a, Xiao Bo^a, Yuichi Murayama^a, Takashi Yokoyama^a, Robert A. Somerville^b, Tetsuyuki Kitamoto^c, Shirou Mohri^{a,*}

^a Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

^b The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Roslin, Midlothian, EH25 9PS, UK

^c Division of CJD Science and Technology, Department of Prion Research, Center for Translational and Advanced Animal Research on Human Diseases, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō, Aoba, Sendai 980-8575, Japan

BSEプリオンは熱に強いことが知られている。蒸製不活化でどの程度不活化されるかについて、BSE感染牛の脊髄を用いて、水分量がそのままのマセレート、水分量が30%減じたセミドライ、70%以上減じたドライの前処理を行い、オートクレーブで不活化を行った。その結果、マセレートでは133℃から150℃で、ウシ型T_gマウスへの感染性を認めたが、155℃以上では感染性を認めなかった。一方、ドライの組織では170℃まで感染性を認めた。PMCA法の限界希釈によりPrP^{Sc}の減弱を定量的に求めた。プリオンを含む組織を乾燥させると熱耐性は増加する。

23

マウスバイオアッセイによるBSE感染性の検出

蒸製熱処理 (20分間)	マセレート (相対含水量100%)		セミドライ (相対含水量70%)		ドライ (相対含水量30%)	
	感染 陽性率	潜伏期間 (平均日数±SD)	感染 陽性率	潜伏期間 (平均日数±SD)	感染 陽性率	潜伏期間 (平均日数±SD)
未処理サンプル	7/7	321 ± 26	8/8	326 ± 41	5/5	319 ± 36
133 C 0.21 MPa	6/6	384 ± 43	6/6	353 ± 28	6/6	337 ± 20
	5/5	345 ± 19	5/5	325 ± 14	4/4	302 ± 13
	6/6	359 ± 26	6/6	339 ± 54	5/5	287 ± 6
136 C 0.22 MPa	6/6	363 ± 39	6/6	349 ± 31	5/5	313 ± 19
	5/5	430 ± 61	5/5	385 ± 36	6/6	306 ± 18
	6/6	388 ± 62	6/6	343 ± 55	6/6	294 ± 12
140 C 0.28 MPa	5/5	417 ± 31	6/6	374 ± 38	5/5	343 ± 41
	5/5	406 ± 35	5/5	444 ± 70	6/6	293 ± 17
145 C 0.32 MPa	4/5	555 ± 64	6/6	426 ± 71	5/5	294 ± 37
	6/6	465 ± 33	5/5	422 ± 35	6/6	301 ± 27
	5/5	476 ± 91	5/5	391 ± 45	6/6	343 ± 36
150 C 0.38 MPa	4/6	536 ± 51	4/4	483 ± 60	5/5	312 ± 43
	3/6	608 ± 72	5/5	503 ± 21	5/5	291 ± 9
155 C 0.44 MPa	0/6	–	2/5	474 ± 144	5/5	309 ± 55
	0/6	–	4/6	583 ± 39	6/6	334 ± 50
	0/5	–	0/5	–	5/5	363 ± 55
160 C 0.52 MPa	0/4	–	0/4	–	6/6	350 ± 46
			0/6	–	5/5	335 ± 42
165 C 0.60 MPa	0/6	–	0/5	–	3/5	467 ± 99
	0/6	–	0/5	–	1/6	654
			0/6	–	0/6	–
170 C 0.68 MPa	0/6	–	0/5	–	6/6	480 ± 71
					0/6	–
					0/6	–

† BSE感染陽性マウスが認められなかった場合は–と表記。

BSEの感染性は牛せき髄マセレートで155℃以上の蒸製熱処理で検出されなかった。

しかしながら、牛せき髄マセレートを乾燥させるとBSEの感染性は170℃まで検出された。

MatsuuraY, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013 ;432(1) 86-91

24

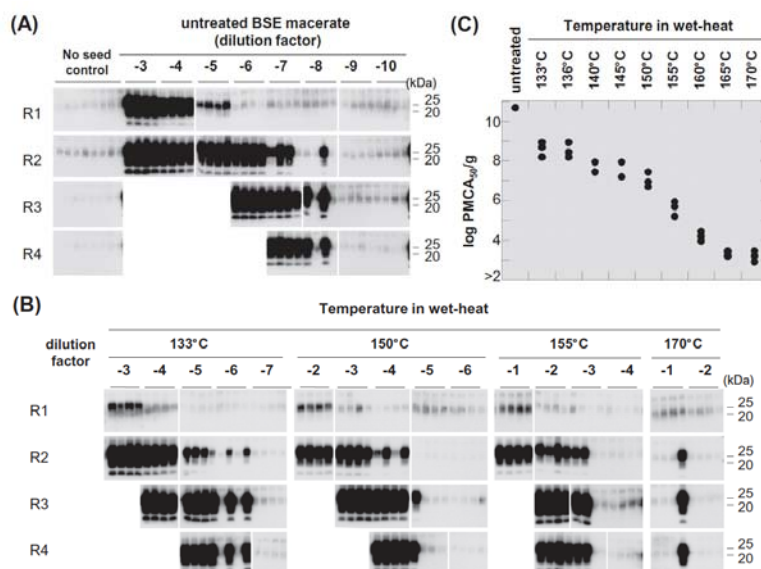


Fig. 2. PMCAによる処理後のBSEプリオンの限界希釈

PMCA法は5秒間超音波処置、1秒間休止を40回の繰り返しを1ラウンドとし、4ラウンド行われた (R1, ラウンド1; R2, ラウンド2; R3, ラウンド 3; R4, ラウンド 4)。10倍希釈した無処理マセレート (A) 処理後のマセレートを (B) とし、それぞれ、pK処理後にウェスタンブロッティングを行った。プロット (B) は133 ° C, 150 ° C, 155 ° C, and 170 ° C の処理を行ったものを示している。それぞれの温度でそれぞれ処理を別々に3検体行い、処理後のマセレートを log PMCA₅₀/g で表し、シーディング活性を (黒丸) でプロットした (C)。なお、検体は2 μ l をとって希釈。

1. わが国のBSEの現況

2. 疫学研究

3. プリオンの体内動態

4. BSEプリオンの試験管内増殖法 (PMCA) と不活化

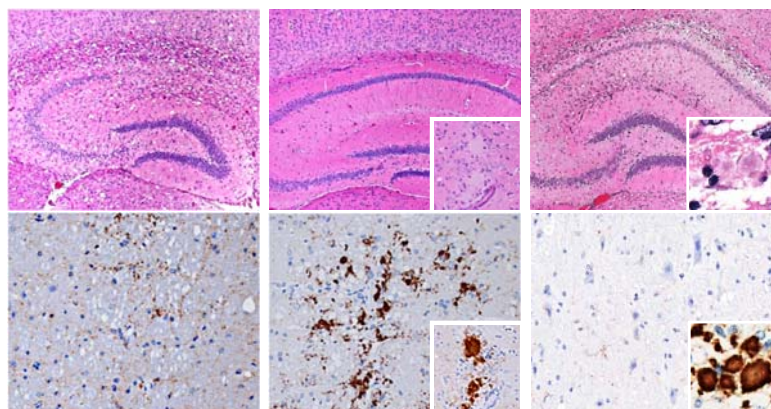
5. 非定型BSEの研究

6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

非定型BSEは伝達性を示し、従来型BSEと異なる性状を有する

病変

PrP^{Sc}



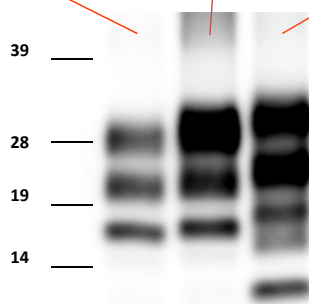
マウスでの
潜伏期:

非定型L型BSE
198日

従来型BSE
223日

非定型H型BSE
316日

ウェスタンブロット法に
よるPrP^{Sc}の解析



病変の程度、PrP^{Sc}の蓄積、
マウスへ伝播した時の潜伏
期PrP^{Sc}の型別に違い

↓
全く異なる「プリオン」?

動衛研 横山原因変更

27

陽性牛は写真の黒毛和種(オス)を出産直後に起立不能となり非定型BSEと診断された。
この牛も4年間、隔離飼育されたが、母子感染は確認できなかった。



黒毛和種、オス
平成18年3月9日 長崎県吉崎市生まれ

日本経済新聞

肉牛、初のBSE確認

長崎 農水省、経路特定急ぐ

厚生労働省は十七日、長崎県吉崎市で繁殖用に飼育されていた雌の黒毛和種一頭がBSE(牛海綿状脳症)感染牛だったと確認した。国内でのBSE感染牛としては二十四頭目で、肉用牛としては初めて。これまで乳用牛でしか感染例がなかったが、肉用牛でも発覚したことから、農林水産省などは感染経路の特定を急ぐ(関連記事を商品面に)

14歳の雌、国内24頭目

感染牛は一九九二年二は「BSEの母子感染は月生まれの十四歳の雌。ないとされており、子牛一頭まで二十頭を出産」の肉を食べても心配はないとされていた。

(ぶんべん) 後の今月十日検査所に持ち込まれた。三日に佐世保市食肉衛生「解体後に大腿だいたした」

部の脱臼が判明し、一次検査で陽性反応が出た。国立感染症研究所で二次検査を実施、十七日に開かれた厚労省専門家会議で確定診断された。

国内では、二〇〇一年九月の千葉県での一例目を皮切りに一九歳の二十三頭の感染を確認。感

28

日本で2例目の非定型BSEの脳には、一糖鎖に富み、プラーク形成するPrP^{Sc}が蓄積していた

Jpn. J. Infect. Dis., 60 (5), 305-308, 2007

Accumulation of Mono-Glycosylated Form-Rich, Plaque-Forming PrP^{Sc} in the Second Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy Case in Japan

Ken'ichi Hagiwara^{1,3*}, Yoshio Yamakawa^{1,3}, Yuko Sato², Yuko Nakamura¹, Minoru Tobiume², Morikazu Shinagawa³ and Tetsutaro Sata^{2,3}

¹Department of Biochemistry and Cell Biology and ²Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, and ³The Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo 100-8916, Japan

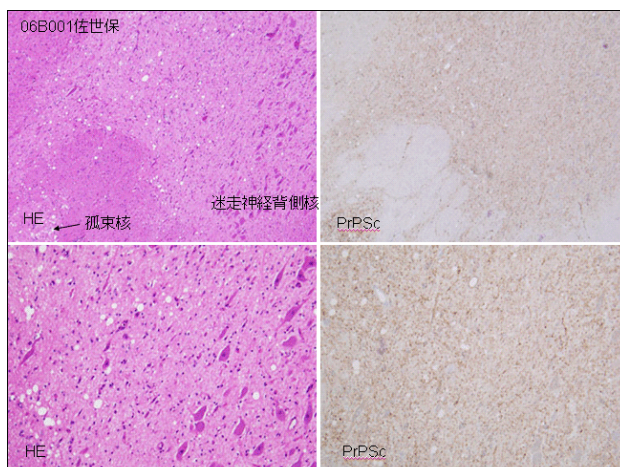
BSE検査で169ヶ月の牛から我が国で2例目となる非定型BSE（JP/24）が摘発された。この牛のPrP^{Sc}は一糖鎖に富み、プラークを形成する等ヨーロッパの非定型BSE（L-BSE）と良く似ていた。

29

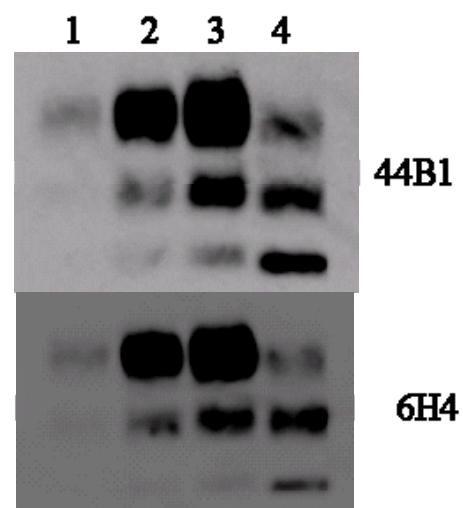
非定型BSEと従来型とのglycoform 及び非糖鎖型の分子量の比較

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）



ウエスタンブロッティングによる解析で3本バンドのパターンとバンドの高さが異なることに注意。第4レーンが非定型BSE（L型非定型BSE；L-BSE）。

30

非定型L型牛海綿状脳症(L-BSE)のヒト以外の霊長類(カニクイザル)への伝達

Jpn J Infect Dis. 2011;64(1):81-4.

Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate.

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.

日本で検出された非定型BSE牛の脳乳剤を用い、低分子質量型の非定型牛海綿状脳症(L-BSE)を2匹のカニクイザルに脳内接種した。接種後19か月及び20か月目にカニクイザルには神経学的症候が現れ、全身麻痺発現の6か月後に安楽死させた。カニクイザルでの潜伏期間及び発症期間は、定型BSE(C-BSE)の伝達実験時に比べて短期間であった。震え、ミオクローヌス反射、麻痺などの臨床兆候は、C-BSE伝達によって惹起された兆候と同様であったが、過剰驚愕や活動低下などの前駆徴候がないことが明らかになった。

異常プリオンたん白質(PrP^{Sc})の大半は中枢神経系組織に限定されていたことが、免疫組織化学法及びウエスタンブロット法により判明した。カニクイザルの脳中に沈着したPrP^{Sc}の糖型は、L-BSEのものと同一プロファイルを示しており、接種材料に用いられた牛の脳のものと一致した。大脳皮質中のPrP^{Sc}染色は、免疫組織化学法で拡散シナプスパターンを示したが、小脳及び脳幹では、微細及び粗大顆粒状で、あるいは小斑で沈着していた。深刻な海綿状変化が大脳皮質にびまんしている一方、ヒトの変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の顕著な特徴である花冠状斑(fluid plaques)は、C-BSEを接種されたカニクイザルでは観察されたが、L-BSEを接種されたカニクイザルでは観察されなかった。

31

Biochemical and Biophysical Research Communications 470 (2016) 563–568



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



L-Arginine ethylester enhances *in vitro* amplification of PrP^{Sc} in macaques with atypical L-type bovine spongiform encephalopathy and enables presymptomatic detection of PrP^{Sc} in the bodily fluids



Y. Murayama ^{a,*}, F. Ono ^b, N. Shimozaki ^a, H. Shibata ^c

^a Influenza Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Ibaraki, Japan

^b Chiba Institute of Science Faculty of Risk and Crisis Management, Choshi, Chiba, Japan

^c Tsukuba Primate Research Center, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Highlights

- Arginine ethylester enhances *in vitro* amplification of L-BSE prion in macaques.
- A sensitive detection method for L-BSE was established using arginine ethylester and polyanions.
- This method enables pre-symptomatic detection of L-BSE prions in bodily fluids.

重要点

- サルの非定型BSE(L-BSE)の試験管内増殖(PMCA)法ではアルギニンエチルエステルが増殖を増強することが判った。
- アルギニンエチルエステルとポリアニオンを添加することによりL-BSEの好感度検出法が確立された。
- この方法を用いることにより、カニクイザルのL-BSE感染実験で臨床症状を表す前に、髄液、だ液、尿からプリオンが検出可能となった

32

PMCA法による L-BSE接種後のカニクイザルの体液中のPrP^{Sc}の検出

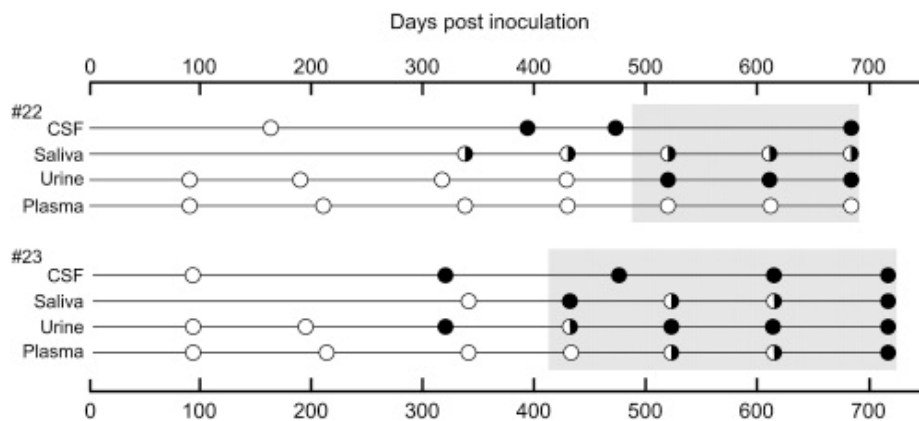


Fig. 3

L-BSEを脳内接種、髄液、だ液、尿、血漿中のPrP^{Sc}を検出した。2個体からそれぞれ2サンプルを採取の後、8ラウンドのPMCA処理を行い2サンプルとも陽性の場合(100%)は黒丸、1サンプルのみ陽性(50%)の場合は半分黒丸、2サンプルとも陰性(0%)の場合は白抜き丸で表されている。臨床症状発現後は灰色の背景で示してある

Y. Murayama, F. Ono, N. Shimozaki, H. Shibata

I-Arginine ethylester enhances in vitro amplification of PrP^{Sc} in macaques with atypical L-type bovine spongiform encephalopathy and enables presymptomatic detection of PrP^{Sc} in the bodily fluids

Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 470, Issue 3, 2016, 563–568

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.105>

33

H-BSE

Torres, J. M. et al. *Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context*. *Emerg Infect Dis* **17**, 1636–1644 (2011).

Transmission of BSE-H isolates in [tg110 mice](#).

BSE-H, unglycosylated PrP^{res} that is higher than BSE-C; H-type, high-type Western blot profile of PrP^{res}; C-type, classical-type Western blot profile of PrP^{res}; C-like, [classical BSE-like; PrP^{res}](#), protease-resistant prion protein; BSE-C, classical BSE.

Baron, T. et al. *Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice*. *PLoS One* **6**, e15839 (2011).

Conclusion/Significance

Our data demonstrate the emergence of a prion strain with [features similar to classical BSE](#) during serial passages of H-BSE in [wild-type mice](#). Such findings might help to explain the origin of the classical BSE epizootic disease, which could have originated from a putatively sporadic form of BSE.

Bencsik, A., Leboindre, M., Debeer, S., Aufauvre, C. & Baron, T. *Unique properties of the classical bovine spongiform encephalopathy strain and its emergence from H-type bovine spongiform encephalopathy substantiated by VM transmission studies*. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**, 211–218 (2013).

Noticeably, second passage of H-BSE in VM mice does not seem to facilitate this strain transmission. With great predominance, the BSE fingerprint of the 301V strain, in terms of incubation periods, PrP^{res} profile, lesion profiles, PrP^d brain mapping, and deposit types, [could be identified in the experiment in VM mice from C57Bl/6 mice harboring C-BSE-like type PrP^d on the second passage after inoculation with cattle H-BSE](#). Thus, H-BSE may consist of, or is able to produce, at least 2 strains of infectious agent: the H strain and a strain resembling C-BSE. This observation is important with regard to public health. Until now, L-BSE was shown to have a potentially even higher risk of transmissibility to humans compared with C-BSE, and our data suggest that H-BSE may also represent a public health concern that remains to be investigated.

これまでの諸外国の伝達試験成績とわが国の感染実験成績を合わせて考えるとH-BSEは壊れやすく、C-BSEのような安定なプリオンに変化しやすいプリオンであると推定できる

34

OPEN

Emergence of a novel bovine spongiform encephalopathy (BSE) prion from an atypical H-type BSE

Received: 23 November 2015

Accepted: 19 February 2016

Published: 07 March 2016

Kentaro Masujin, Hiroyuki Okada, Kohtaro Miyazawa, Yuichi Matsuura, Morikazu Imamura, Yoshifumi Iwamaru, Yuichi Murayama & Takashi Yokoyama

非定型BSE (H-BSE) をウシ型トランスジェニックマウスで継代感染実験を行うと新しいタイプのBSEが現れる。出現した新しいプリオンをウシに感染実験することによりそれを確認した。

35

Table 1:

H-BSEのトランスジェニックマウス (TgBoPrP) への伝達試験と潜伏期間

Passage history					Remarks
First	Second	Third	Fourth	Fifth	
320.1 ± 12.2 ^a (10/10) ^b [318 ^c]	226.9 ± 4.2 (7/7) [230]	215.6 ± 5.0 (40/40)			H-BSE
		#5 ^d [207]	220.8 ± 0.3 (7/7)		
		#1 [209]	214.0 ± 10.8 (5/5)		
		#6 [213]	209.6 ± 0.8 (6/6)		
		#8 [215]	223.3 ± 7.8 (4/4)		
		#2 [216]	220.0 ± 4.4 (6/6) [234]	216.7 ± 3.0 (12/12)	
		#7 [216]	210.3 ± 1.7 (6/6)		
		#4 [228]	225.0 ± 0 (6/6)		BSE-SW
		#3 [221]	108.8 ± 4.0 (20/20) [106]	97.3 ± 3.7 (10/10)	

^aAverage ± standard deviation (days).

^bNumbers of affected/inoculated mice are shown in parentheses.

^cIncubation periods of mice used for subsequent passages are shown in brackets.

^dExperimental group number at fourth passage: each experiment used a different brain sample from affected mice at third passage.

36

BSE-SWを感染させた牛のコアプリオン蛋白質のウェスタンブロッティング解析

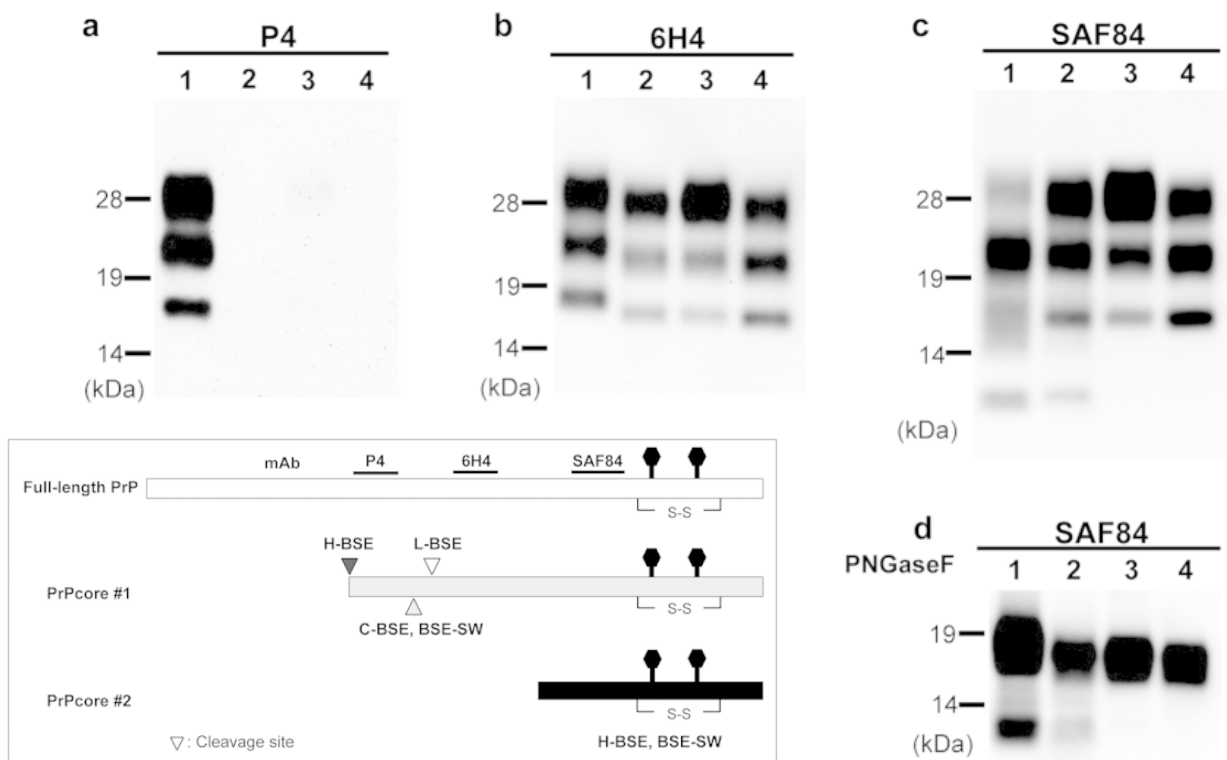


Figure 5: Western blot analysis of PrPcore from BSE-SW-affected cattle.

PrPcore from the affected cattle were detected using mAbs: P4 (a), 6H4 (b), and SAF84 (c).

Lane 1, H-BSE; Lane 2, BSE-SW; Lane 3, C-BSE; Lane 4, L-BSE. All the samples were digested with 40 μ g/ml PK at 37 ° C for 1 h. Digested aliquots were treated with PNGaseF, and were probed using mAb SAF84 (d). Equivalents of 0.5 mg brain tissues were loaded. Molecular markers are shown on the left (kDa).

37

1. わが国のBSEの現況

2. 疫学研究

3. プリオンの体内動態

4. BSEプリオンの試験管内増殖法(PMCA)と不活化

5. 非定型BSEの研究

6. 鹿消耗病 (Chronic Wasting Disease : CWD)

CWDの概要

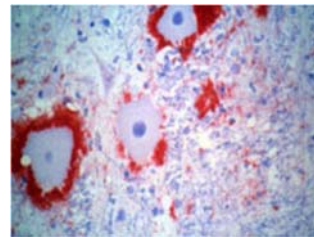
- ・3-5歳の発症が最も多い（17ヶ月から15歳くらいまで）
- ・性差なし、季節性もない
- ・病症期間: 通常は14ヶ月から24ヶ月くらい
- ・潜伏期間: 最低17ヶ月から、最大は不明
- ・発生確認: 米国、カナダ、韓国、今年に入ってノルウェーでも検出



Note the poor body condition, yet nice rack



Classic clinical signs of CWD....
emaciation, wide stance, lowered head,
droopy ears and excessive salivation.



Stained Prions in Obex.

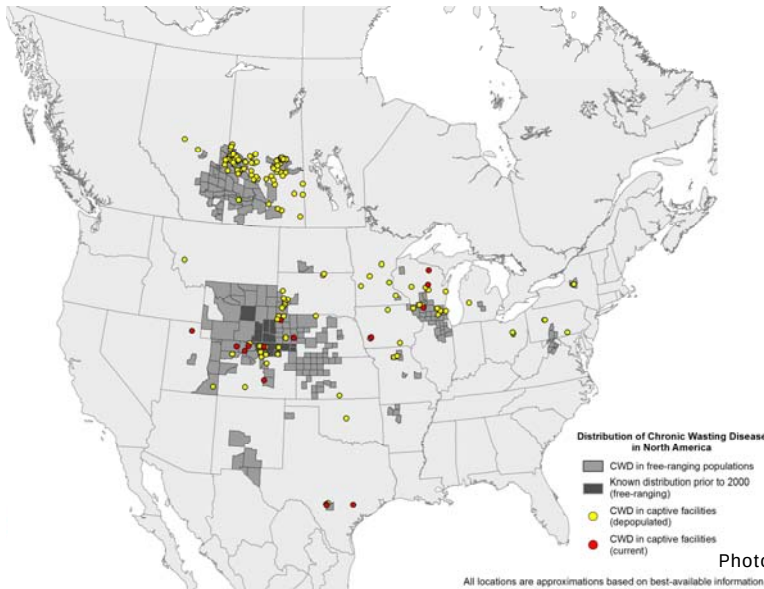


Photo Courtesy of Wyoming Game and Fish Department 39

CWDの沿革

- 1960年代後半よりその発生が知られている
（当時は栄養失調、中毒が疑われていた）
- 1978年: 脳の空胞変性によりCWDがプリオン病として認識された
コロラド州、ワイオミング州の野生シカで発生
- 1996年: カナダで養鹿（エルク）に初発生
- 1990年代後半～2000年代: 北アメリカでサーベイランスが実施
- 2001年: 韓国で発生確認（カナダからの輸入したエルク、23頭陽性）

流行地域に生息する野生のミールジカでは最大15%程度の個体が感染

◇野生のシカ間で伝播が生じている→病気の制御が困難

◇国内のモニタリングのための調査と侵入防止が必要

ご清聴ありがとうございました！