

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
(1301)

食品健康影響評価技術研究(平成25年～平成28年)

松浦 裕一 (Yuichi MATSUURA, D.V.M, Ph.D)

農研機構動物衛生研究部門

ウイルス・疫学研究領域牛ウイルスユニット

越境性感染症研究領域プリオン病ユニット

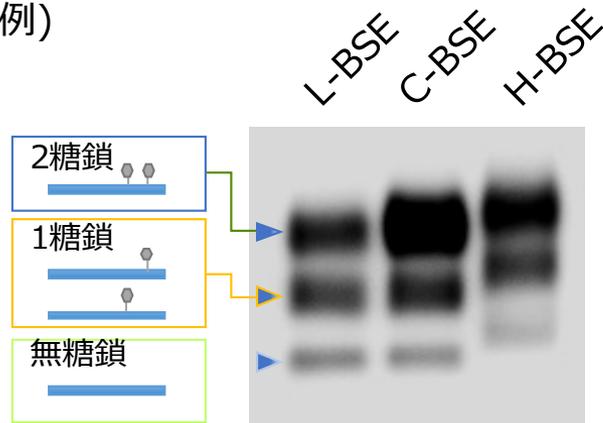
研究目的

非定型BSE牛脳乳剤をヒト化マウスへ投与する感染実験を行い、非定型BSEのヒトへの感染リスクを評価・推定することを目的とする。

<非定型BSE>

- ・ 自然に発生する可能性
- ・ 少なくとも2種類の異なる病態を示す

(例)

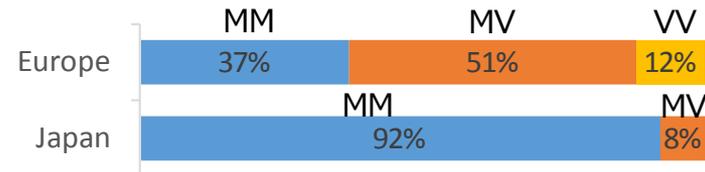


BSE牛の脳を蛋白分解酵素で処理した後、異常プリオン蛋白質を検出すると、非定型 (L, H-type) のバンドパターンは定型(C-type)と異なる。

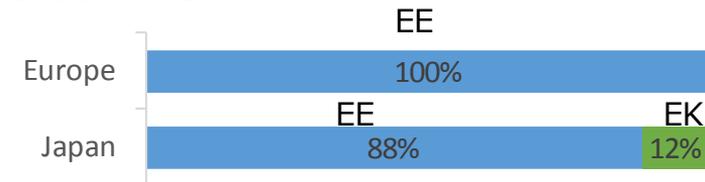
<ヒトの正常なアミノ酸多型>

- ・ ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の病態や感受性に影響する

codon 129



codon 219

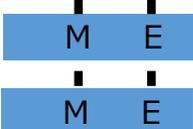
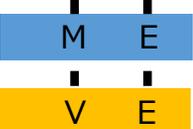
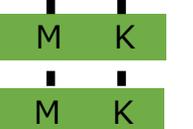


Kobayashi et al., 2015,
Acta Neuropathologica 130(2), 159-170

研究概要

ヒトプリオン蛋白質ノックインマウス(ヒト化マウス)

ヒト化マウスの遺伝子型 (codon 129 と219のアミノ酸配列)

| 129MM・219EE | 129MV・219EE | 129VV・219EE | 129MM・219KK |
|--|--|--|--|
| 129 219  | 129 219  | 129 219  | 129 219  |

マウス系統間で組換え遺伝子の発現量が等しいため、BSEの感受性を比較できる

BSE感染牛の脳

- L-BSE** : 国内L-BSEの実験感染例
- H-BSE** : カナダH-BSEの実験感染例
- C-BSE** : 英国野外例

投与ルート

- ・ 直接経路 : **脳内投与**
- ・ 末梢経路 : **腹腔内投与** **経口投与**

ヒト化マウスを用いたBSE感染実験で **3要因**を分析した

BSEのヒト化マウスへの感染実験

- ・ L-BSEやH-BSEはヒト化マウスに感染しなかった（最長観察期間891日）
- ・ C-BSEはヒト化マウス（129MM・219EEや129MM・219KK）に感染

BSEのヒト化マウスへの感染性

(BSE感染陽性数個体/投与数個体)

| ヒト化マウス の遺伝子型 | L-BSE | | H-BSE | | C-BSE | |
|-----------------|-------|------|-------|------|-------|-------|
| | 脳内* | 腹腔内† | 脳内* | 腹腔内† | 脳内* | 腹腔内† |
| 129MM・219EE | 0/8 | 0/10 | 0/9 | 0/9 | 0/12 | 3/8 |
| 129MV・219EE | 0/10 | 0/10 | 0/5 | 0/9 | 0/10 | 0/11 |
| 129VV・219EE | 0/7 | 0/8 | 0/9 | 0/9 | 0/5 | 0/8 |
| 129MM・219KK | 0/6 | 0/10 | 0/15 | 0/8 | 3‡/7 | 10/10 |

* 10%ウシ脳乳剤の20 μLを脳内に投与。マウスを発病まで観察して、脳に異常プリオン蛋白質が蓄積した個体をBSE感染陽性とした。

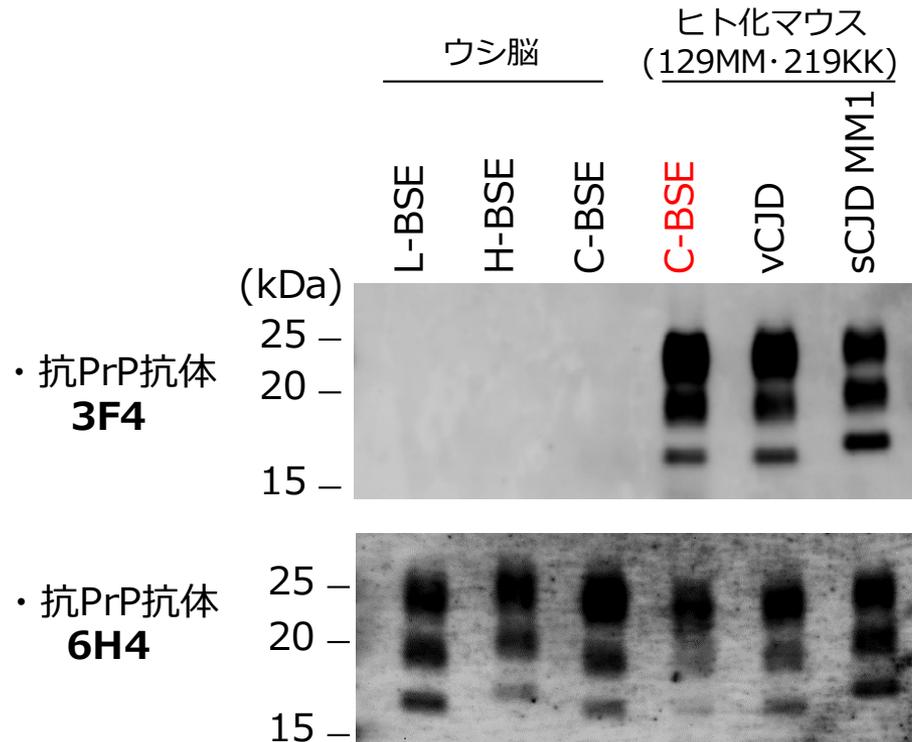
† 10%ウシ脳乳剤の500 μLを腹腔内に投与。150日後の脾臓に異常プリオン蛋白質が蓄積した個体をBSE感染陽性とした。

‡ BSE感染マウスの潜伏期間は796日、824日、839日。

C-BSE感染ヒト化マウス(129MM・219KK) 脳内投与後839日

[ウエスタンブロット法]

蛋白質分解酵素(PK)抵抗性の異常プリオン蛋白質の検出



vCJD: 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病感染ヒト化マウス (129MM・219KK), 脳内投与後505日

sCJD MM1: 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(MM1)感染ヒト化マウス (129MM・219KK), 脳内投与後567日

C-BSE感染ヒト化マウスの異常プリオン蛋白質は、C-BSE感染牛やvCJD感染と同様なバンドパターンを示し、C-BSEの特徴を保持していた。

BSEのヒト化マウスへの胃ゾンデを用いた経口感染実験

- ・ L-BSEやH-BSE、C-BSEはヒト化マウスに感染しなかった（最長観察期間891日）

BSEのヒト化マウスへの経口感染性

(BSE感染陽性数個体/投与数個体)

| ヒト化マウスの遺伝子型 | L-BSE | | H-BSE | | C-BSE | |
|-------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | マセレート | 10% | マセレート | 10% | マセレート | 10% |
| 129MM・219EE | 0/9 | 0/8 | 0/10 | 0/8 | 0/9 | 0/9 |
| 129MV・219EE | 0/7 | 0/10 | 0/9 | 0/9 | 0/13 | 0/10 |
| 129VV・219EE | 0/8 | 0/9 | 0/8 | 0/11 | 0/8 | 0/10 |
| 129MM・219KK | 0/13 | 0/8 | 0/10 | 0/9 | 0/14 | 0/10 |

ウシの脳をすりつぶしただけのマセレートもしくは10%脳乳剤の50 μ Lを胃ゾンデを用いて経口投与し、マウスを発病まで観察して、脳や脾臓に異常プリオン蛋白質が蓄積した個体をBSE感染陽性とした。

- ・ L-BSEやH-BSE、C-BSEの経口感染性に違いはあるのか？
- ・ ヒトの胃や腸の消化酵素液による分解性に違いがあるのか？

ウシ化マウスをもちいたBSE感染実験

- いずれのBSEも高い希釈液の脳内投与でも感染した。
- L-BSEとC-BSEはウシ化マウスに経口感染したが、H-BSEは感染しなかった。

BSEの投与ルートによる感染性の比較

| | 投与 ルート | マセ レート | ウシ脳の希釈倍率 (10 ⁿ) | | | | | | 感染価 (log LD ₅₀ /g) |
|-------|-----------|-----------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|----------------------------------|
| | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | |
| L-BSE | 脳内 | — | 12/12 | — | 9/9 | 4/9 | 0/9 | 0/10 | 5.6 |
| | 経口 | 1/9 | 0/7 | 0/3 | — | 0/4 | — | 0/2 | — |
| H-BSE | 脳内 | — | 6/6 | — | 4/4 | 3/3 | 2/3 | 0/4 | 6.9 |
| | 経口 | 0/10 | 0/9 | 0/5 | — | 0/4 | — | 0/4 | — |
| C-BSE | 脳内 | — | 15/15 | — | 5/5 | 5/5 | 1/4 | 0/5 | 6.5 |
| | 経口 | 2/9 | 1/8 | 0/4 | — | 0/4 | — | 0/3 | — |

(BSE感染陽性数個体/投与数個体) — : 実施せず。

人工消化酵素処理によるBSEの感染性の減弱

人工胃液：2 g/L ペプシン, pH2-3の溶液で37 °C 1 時間反応

人工膵液：4 g/L パンクレアチン, 6 g/L 胆汁, pH 8-9の溶液で37 °C 2 時間反応

加熱処理：100°C10分間（マウスへの脳内投与前に行う）

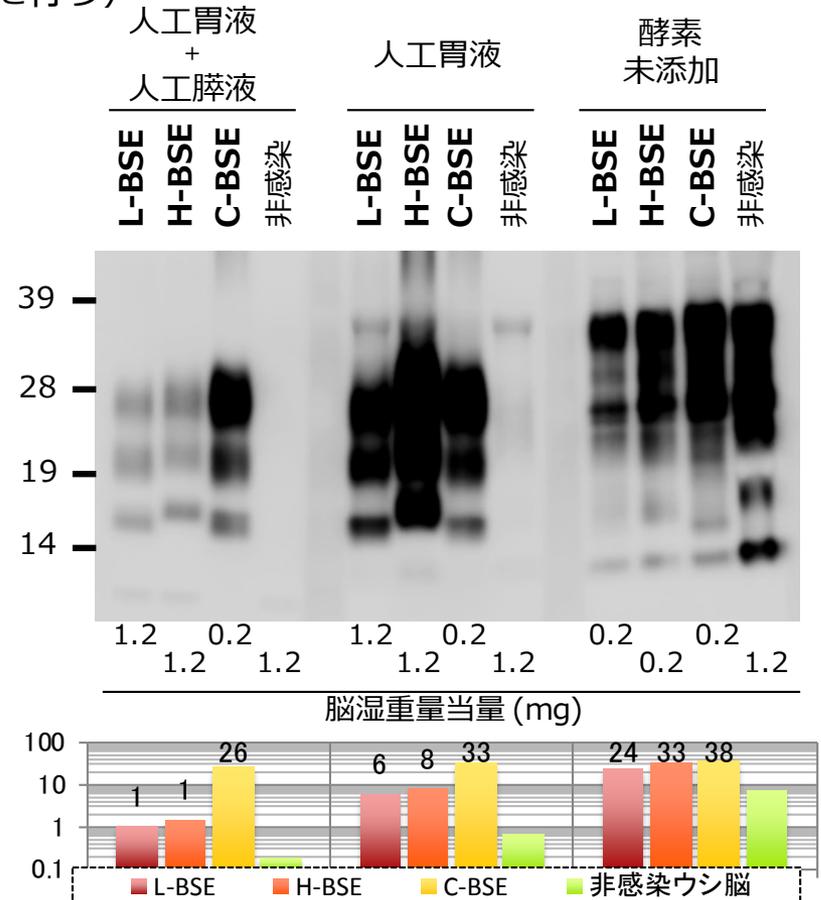
ウシ型遺伝子過発現マウスを用いた感染実験

| 牛脳乳剤 (log LD ₅₀ /g) | 人工消化 酵素処理 | BSE 感染率 | 潜伏期間 (日数) |
|-----------------------------------|--------------|------------|--------------|
| L-BSE (6.4) | + | 0/6 | |
| | - | 0/5 | |
| H-BSE (7.0) | + | 0/6 | |
| | - | 0/5 | |
| C-BSE (6.0) | + | 5/5 | 327 |
| | - | 5/5 | 325 |
| 非感染 | + | 0/6 | |

+：ペプシンとパンクレアチン添加

-：消化酵素未添加

- 人工消化酵素によるL-BSEやH-BSEの感染性の減衰は不明



L-BSEやH-BSEは、C-BSEより不活化されやすい可能性が示唆された。

考察とまとめ

- 非定型BSEのヒトへの感染リスクを定量的評価することは困難。
 - ・ 非定型BSEは脳内、腹腔内、経口投与でヒト化マウスに感染不成立。
 - ・ C-BSEは脳内と腹腔内ルートでヒト化マウスに感染。
 - ➡ 非定型BSEのヒト化マウスへの感染リスクは、C-BSEより小さい。
 - ➡ 129MM・219KK型と129MM・219EE型のアミノ酸多型が、C-BSEの牛から人への感染のリスクファクターとなりうる。

- 非定型BSEのウシ化マウスへの経口感染性
 - ・ L-BSEやC-BSEは経口感染したが、H-BSEは感染しなかった。
 - ・ C-BSEは10%乳剤でも感染したが、L-BSEはマセレート（100%）でのみ感染した。
 - ➡ 非定型BSEの牛への感染性はC-BSEより低い可能性が考えられた。

- 人工消化酵素液の処理によるBSEプリオンの減弱は不明のまま。
 - ・ C-BSEは人工消化液の酵素処理で感染性の減弱は僅かであった。
 - ・ L-BSEやH-BSEでは、酵素未添加の処理過程でも感染性が減弱
 - ➡ 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。