

—最近における動物衛生研究情報(Ⅲ)—

わが国の黒毛和牛に認められた非定型BSEプリオンの性状

舂甚賢太郎<sup>†</sup> (動物衛生研究所プリオン病研究センタープリオン病研究チーム研究員)

横山 隆 (同研究チーム長)



舂 甚 賢 太 郎

1 はじめに

牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE) は、中枢神経の空胞変性を主徴とする致死性の退行変性疾患である。BSE 感染牛の臨床症状は音・接触に対する過敏反応及び異常姿勢を示し、発症末期には起立不能などが認められる。その潜伏期間は

長く、4～5年以上である。1986年に英国で初めて発見されたBSEは [1]、日本を含め25カ国で発生し、これまで19万頭を超える牛に確認されている。BSEの起源は、スクレイピーに汚染された飼料の摂取をはじめ様々な推測がなされているが、十分な科学的根拠は得られておらず、未解明のままである。その後のBSEの世界的蔓延は、BSE感染牛から作られた肉骨粉を飼料としたことに起因する。

近年、従来のBSEとは性状の異なるBSE (非定型BSE) が日本、ヨーロッパ諸国及び北米で確認されている。非定型BSEの起源及びその性状について未だ不明な点が多く、その解明が重要な課題となっている。本稿では、BSEとその現状について述べるとともに、わが国2例目の非定型BSEについて最新の知見を紹介する。

2 BSEの病原体プリオン

BSEの病原体としてプリオン (感染性をもつ蛋白質粒子) が考えられている [2]。プリオンによって引き起こされる疾患はプリオン病または伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathy; TSE) と呼ばれており、BSEは牛のプリオン病とも呼ぶことができる。牛以外の動物におけるプリオン病として、羊及び山羊のスクレイピー (scrapie)、鹿の慢性消耗症 (chronic wasting disease; CWD) が知られている [2]。また、人にもプリオン病は存在する。動物のプリオン病は全て感染によって引き起こされるが、一方、人のプリオン病は、その発病機序によって、いくつかに分類さ

れ、散発的に発生する孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sporadic Creutzfeldt-Jakob disease; sCJD)、遺伝性疾患として家族性CJD (familial CJD; fCJD) 及びゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome; GSS)、そして感染による医原性CJD (iatrogenic CJD; iCJD) 及び変異型CJD (variant CJD; vCJD) などが知られている。

病原体プリオンの本態は未だに明らかとされていないが、プリオンの主要構成成分として、宿主体内で翻訳される正常プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) の構造異性体である異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) が考えられている。両者間の立体構造の相違が、蛋白質分解酵素 (プロテナーゼ K; PK) に対する部分抵抗性、凝集性、界面活性剤への不溶性及び感染性を生じさせていると考えられている。

3 BSEの現状

現在、世界的にBSEの発生頭数は、減少傾向にある。英国では、1992年の約3万7千頭をピークに年間発生頭数は減少し、2009年は6月までに6頭と激減している。わが国では、2001年の初発例から年間発生頭数は増加傾向にあったが、2006年をピークに発生頭数は減少し、2009年は1頭の発生報告があるのみである (2009年7月現在)。これは、牛・羊など反芻動物への肉骨粉の給餌を禁止したことが効果的であったことを示している。

4 BSEとvCJD:牛から人へ

1996年英国において、患者の年齢、臨床症状、病理所見が従来のsCJDとは著しく異なる変異型CJD (vCJD) 患者が見いだされた [3]。vCJD患者の多くがBSE発生国の英国をはじめ、EU諸国で在住または滞在歴があるとの疫学的知見から、vCJDはBSE感染牛由来の食品を摂取したことによる牛から人へのBSEの伝播により発生した可能性が示唆された。その後、実験動物を用いた伝達試験において、vCJDプリオンとBSEプリオンが同様の生物学的性状を示すこと、vCJD及びBSE

<sup>†</sup> 連絡責任者: 舂甚賢太郎 (動物衛生研究所プリオン病研究センタープリオン病研究チーム)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7757 E-mail: masujin@affrc.go.jp

プリオン由来PrP<sup>Sc</sup>の生化学的性状が類似していたことから、vCJDとBSEは同一のプリオンに起因すると結論づけられた [4-6]。これを受け、BSEは人と動物の共通感染症に加えられるとともに食の安全・安心の問題を提起した。

現在までに200名以上のvCJD患者が確認されているが、そのほとんどが英国に集中している。わが国におけるvCJD患者は1例報告されているが、英国滞在時に感染した可能性が示唆されている。英国でのvCJD患者は、2000年の28人をピークに減少傾向にあるが、プリオン病の潜伏期間の長さから、未発症の患者の存在が危惧されている。vCJDの発生にともない最も懸念されているのが、vCJD患者らの医療行為を介した健常者への二次感染（医原性CJD）の発生である。プリオンは、熱及び消毒薬に強い抵抗性を示すことから、一般の医療消毒法での不活化は非常に困難である。また、近年、vCJD患者の輸血を介したvCJD患者が報告されていることから [7]、医療業務に多大な影響を及ぼすのは必須である。したがって、BSEを牛の病気として制御・制圧することが非常に重要である。

## 5 BSEの摘発

BSEの清浄化及び牛肉の安心・安全を確保するためにも、BSE感染牛の早期摘発は重要な課題である。BSEの診断は、唯一の疾病特異的マーカーであるPrP<sup>Sc</sup>の有無を指標に行われる。BSEにおけるPrP<sup>Sc</sup>の蓄積は脳や脊髄、眼や頭部の神経系組織にそのほとんどが限局している。そのため、現在までにBSEにおける生前診断は確立されておらず、死亡または病理解剖後にPrP<sup>Sc</sup>が最も蓄積する脳を検査部位として診断は行われる。

BSE診断法として、①固相酵素免疫測定（ELISA）法、②ウェスタンブロッティング（WB）法、③免疫組織化学染色（IHC）法が用いられている。診断はPrP<sup>Sc</sup>の検出により行われるが、PrP<sup>Sc</sup>と宿主本来のPrP<sup>C</sup>は同様のアミノ酸配列により構成されているため、検体試料中の両者を識別する必要がある。そこで、両者の識別にはPrP<sup>Sc</sup>がもつPKに対する抵抗性が利用されている。ELISA法は、PK処理によりPrP<sup>C</sup>を消化した試料を抗プリオン蛋白質（PrP）抗体またはPrP<sup>Sc</sup>と強く結合する化合物が固相化されているプレートに添加し、選択的にPrP<sup>Sc</sup>を捕捉させた後、抗PrP抗体反応及び酵素発色により検出する。ELISA法を応用したBSE迅速診断キットが複数開発されており、多数の検体を迅速・簡便に検査できることから、BSEの1次スクリーニングに利用されている。一方、ELISA法のデメリットとして、非特異的な反応による偽陽性シグナルと特異的な陽性シグナルを識別することができない場合がある。WB法は、検体試料をPK処理した後、ポリアクリルアミドゲル電気

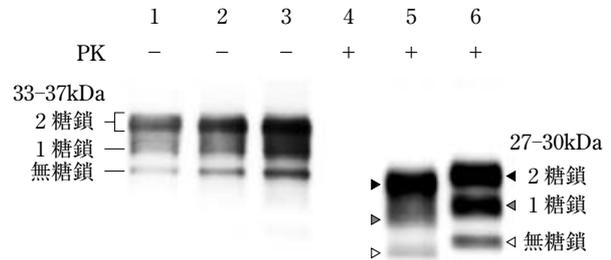


図1 WB法によるPrP<sup>Sc</sup>の検出  
 プリオン非感染マウス脳（レーン1, 4）  
 BSEプリオン感染マウス脳（レーン2, 5）  
 スクレイピープリオン感染マウス脳（レーン3, 6）  
 PK処理群（レーン4, 5, 6）  
 BSEプリオン感染マウス脳由来PrP<sup>Sc</sup>とスクレイピー  
 プリオン感染マウス脳由来  
 PrP<sup>Sc</sup>間でバンドパターン及び分子量に違いがある  
 ことがわかる。

泳動により蛋白質を分離し、膜に転写後、抗PrP抗体と反応させる。非感染個体ではPK処理によりPrP<sup>C</sup>は分解され、バンドは検出されない。一方、感染個体では完全長のPrP<sup>Sc</sup>から部分分解されたPrP<sup>Sc</sup>断片が残り、PrPには2カ所の糖鎖付加部位があるため、無糖鎖、1糖鎖、2糖鎖の3本のバンドとして検出される（図1）。WBは、PrP<sup>Sc</sup>の分子量やバンドパターンにより非特異的な反応との識別が可能であることから、BSEの確定診断に用いられている。また、プリオンには株が存在することが知られており、プリオン感染個体より得られたPrP<sup>Sc</sup>のバンドパターン及びその分子量は、プリオン株の分類の指標にも利用されている（図1）。IHC法は、脳組織上のPrP<sup>Sc</sup>の蓄積の有無や蓄積部位を調べることを可能にする。ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色による神経網や神経細胞に形成される空胞などの病理学的所見と関連づけて診断は行われる。近年、PrP<sup>Sc</sup>高感度検出法として、Protein-misfolding cyclic amplification（PMCA）法が目ざされている [8]。PMCA法は、試験管内で基質となるPrP<sup>C</sup>と鋳型となるごく微量のPrP<sup>Sc</sup>を混合し、インキュベーションと超音波処理を繰り返すことで、PrP<sup>Sc</sup>の増幅を可能とし、検出感度が飛躍的に向上する。スクレイピー感染ハムスターより経時的に採取された体液（血液・尿）を試料とした実験において、PMCA法の生前診断への有効性が示されている [9]。PMCA法を用いたBSEの生前診断が期待されるが、今後さらなる改良が必要である。

## 6 非定型BSE

羊及び山羊のプリオン病であるスクレイピーには、生物学的及び生化学的性状の異なる複数のプリオン株が存在することが知られている。一方、BSEは単一のプリオンにより引き起こされる疾病として考えられていた。し

表1 BSE/JP24プリオンの伝達試験

接種材料	マウス	発症数/ 接種数	潜伏期間 (日) (Mean ± SD)	病理学的所見			
				空胞変性	PrP ブラーク	蓄積形状	PrP <sup>Sc</sup> の蓄積分布
定型BSE							
Primary passage	TgBoPrP	11/11	223.5 ± 13.5	空胞変性あり	あり	粗い顆粒状	神経核を中心に蓄積
2 <sup>nd</sup> passage	TgBoPrP	15/15	214.9 ± 4.8		なし	細かい顆粒状	
Primary passage	野生型	5/5	408.6 ± 28.2	空胞変性あり	なし	細かい顆粒状	神経核を中心に蓄積
BSE/JP24							
Primary passage	TgBoPrP	10/10	197.7 ± 3.4	著しい空胞変性	なし	細かい顆粒状	脳全体に一樣に蓄積
2 <sup>nd</sup> passage	TgBoPrP	10/10	152.2 ± 3.1				
Primary passage	野生型	0/23	>649	臨床症状および脳でのPrP <sup>Sc</sup> の蓄積は認められない			

かしながら、2003年に日本、そして2004年にイタリアで従来のPrP<sup>Sc</sup>とは異なる分子量及びバンドパターンを示すBSE症例が発見された [10, 11]。この症例は、非定型BSE (atypical BSE) と名付けられ、従来のBSEは定型BSE (classical-BSE : C-BSE) と呼ばれるようになった。さらに、フランスにおいて、定型BSE及び日本・イタリアの非定型BSE由来PrP<sup>Sc</sup>に比べ、その分子量が大きいBSE症例が発見され [12]、BSEプリオンにも複数の株が存在することが明らかとなった。現在、非定型BSEはPrP<sup>Sc</sup>の分子量の違いを指標として、H型BSEまたはL型BSEの2つに分類され、日本、ヨーロッパ諸国及び北米で、約50頭あまりの症例が確認されている [13-16]。非定型BSEの主徴として、症例の多くが8歳以上の老齢牛であり、そのほとんどがBSE検査により摘発されている。臨床症状として、イタリアの非定型BSE感染実験において、沈鬱及び軽度な脊柱後弯症が接種牛に認められたという報告があるが [17]、その症例数の少なさは否めない。明確な臨床症状を示さない非定型BSEが見いだされたのは、定型BSEを摘発・淘汰するシステムが整備されたことが大きな要因となっている。したがって、非定型BSEは各国のBSE対策の強化により発見されたBSEといえるかもしれない。

### 7 わが国の黒毛和牛に認められた非定型BSEプリオンの性状

2006年3月、国内24例目のBSE感染牛として発見された169カ月齢の黒毛和牛は、従来のBSE感染牛 (C-BSE) とは異なるWBのバンドパターンを示すPrP<sup>Sc</sup>が認められたことから、わが国2例目の非定型BSE (BSE/JP24) として診断された [16] (図2)。非定型BSEの詳細な性状を知ることは、わが国におけるBSE対策及びその起源を検討する上で重要である。プリオンの性状解析には、実験動物を用いた伝達試験が有効な手段とされ、実験動物に対する伝達性の有無及びその潜伏期間、さらに伝達性が認められ動物脳内での空胞変性の程

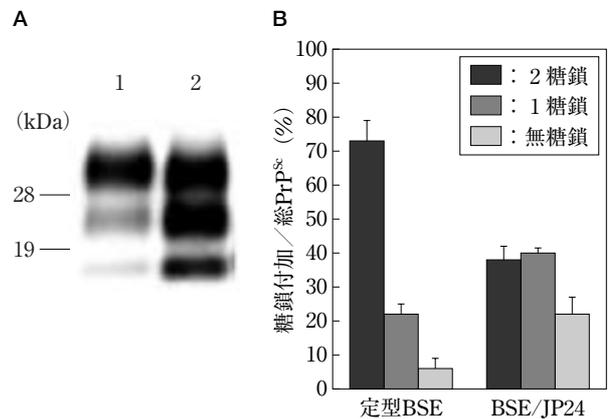


図2 WB法を用いた定型BSE及びBSE/JP24由来PrP<sup>Sc</sup>の解析

- A) 定型BSEプリオン感染牛由来PrP<sup>Sc</sup> (レーン1), BSE/JP24プリオン感染牛由来PrP<sup>Sc</sup> (レーン2)  
 B) 定型BSE及びBSE/JP24プリオン由来PrP<sup>Sc</sup>における糖鎖付加パターン

度、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積パターン及びその蓄積部位などの病理学的所見によって判断される。そこで我々はBSE/JP24プリオンの性状を明らかにするため、牛型プリオン蛋白質過発現マウス (TgBoPrP) 及び野生型マウスに伝達試験を行った。

その結果、BSE/JP24プリオンはTgBoPrPマウスに伝達性を示し、その潜伏期間 (約197日) はC-BSEプリオンの潜伏期間 (約223日) よりも短く、C-BSEプリオンは野生型マウスに伝達する (約408日) のに対し、BSE/JP24プリオンは野生型マウスに伝達性を示さない (649日以上) プリオンであることがわかった (表1)。興味深い事にBSE/JP24プリオンをTgBoPrPマウスで継代すると、その潜伏期間は約152日となり、初代と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に短縮することが明らかとなり、これはC-BSEには認められない性状であった。病理学的所見において、BSE/JP24プリオンを接種したTgBoPrPマウスの脳内における空胞変性の程度、PrP<sup>Sc</sup>

の蓄積パターン及び蓄積部位は、C-BSEプリオンを接種したTgBoPrPマウスとは明らかに異なった(表1)。また、BSE/JP24プリオン由来PrP<sup>Sc</sup>の生化学的性状について検討したところ、BSE/JP24プリオン由来PrP<sup>Sc</sup>はC-BSEプリオン由来PrP<sup>Sc</sup>に比べ、PKに対して感受性であった。これらのことから、BSE/JP24プリオンは、C-BSEプリオンとは生物学的及び生化学的性状が異なる新しいBSEプリオンであると考えられた[18]。

## 8 おわりに

わが国の非定型BSEに伝達性が確認された。欧州各国で発見された非定型BSEにも伝達性が確認されている[14, 19, 20]。非定型BSEの起源として、その多くが老齢牛での発生であることから孤発性BSEの可能性も否定できない。BSEの清浄化を達成するためには、老齢牛に対するBSE検査を継続する必要がある。牛肉の安全を担保するためにも非定型BSEの人への感染リスク及び牛体内での非定型BSEプリオンの動態に関する知見の集積が必要である。

## 参考文献

- [1] Wells GA, Scott AC, Johnson CT et al. : *Vet Rec*, 121, 419-420 (1987)
- [2] Prusiner SB : *Science*, 252, 1515-1522 (1991)
- [3] Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al. : *Lancet*, 347, 921-925 (1996)
- [4] Collinge J, Sidle KC, Meads J et al. : *Nature*, 383, 685-690 (1996)
- [5] Hill AF, Desbruslais M, Joiner S et al. : *Nature*, 389, 448-500, 526 (1997)
- [6] Bruce ME, Will RG, Ironside JW et al. : *Nature*, 389, 498-501 (1997)
- [7] Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS et al. : *Lancet*, 363, 417-421 (2004)
- [8] Saborio GP, Permanne B, Soto C : *Nature*, 411, 810-813 (2001)
- [9] Murayama Y, Yoshioka M, Okada H et al. : *J Gen Virol*, 88, 2890-2898 (2007)
- [10] Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K et al. : *Jpn J Infect Dis*, 56, 221-222 (2003)
- [11] Casalone C, Zanusso G, Acutis P et al. : *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 3065-3070 (2004)
- [12] Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T : *EMBO Rep*, 5, 110-114 (2004)
- [13] Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG et al. : *J Clin Microbiol*, 45, 1821-1829 (2007)
- [14] Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG et al. : *Vet Microbiol*, 117, 103-116 (2006)
- [15] Richt JA, Kunkle RA, Alt D et al. : *J Vet Diagn Invest*, 19, 142-154 (2007)
- [16] Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y et al. : *Jpn J Infect Dis*, 60, 305-308 (2007)
- [17] Lombardi G, Casalone C, D'Angelo A et al. : *PLoS Pathog*, 4, e1000075 (2008)
- [18] Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y et al. : *Prion*, 2, 123-128 (2008)
- [19] Beringue V, Andreoletti O, Le Dur A et al. : *J Neurosci*, 27, 6965-6971 (2007)
- [20] Capobianco R, Casalone C, Suardi S et al. : *PLoS Pathog*, 3, e31 (2007)