



道総研

非定型BSEの試験研究について

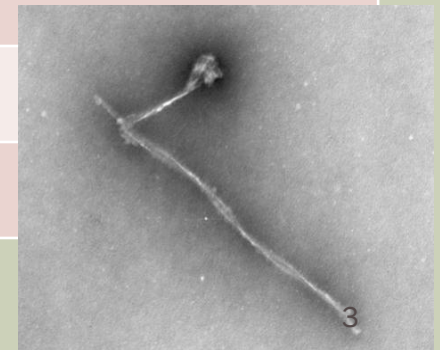
道総研
畜産試験場
福田茂夫

非定型BSEの試験研究について

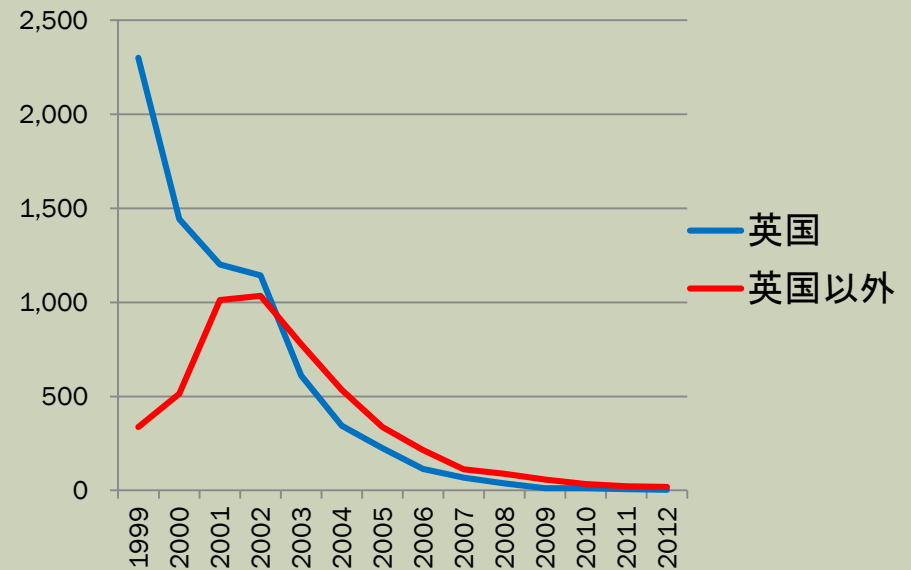
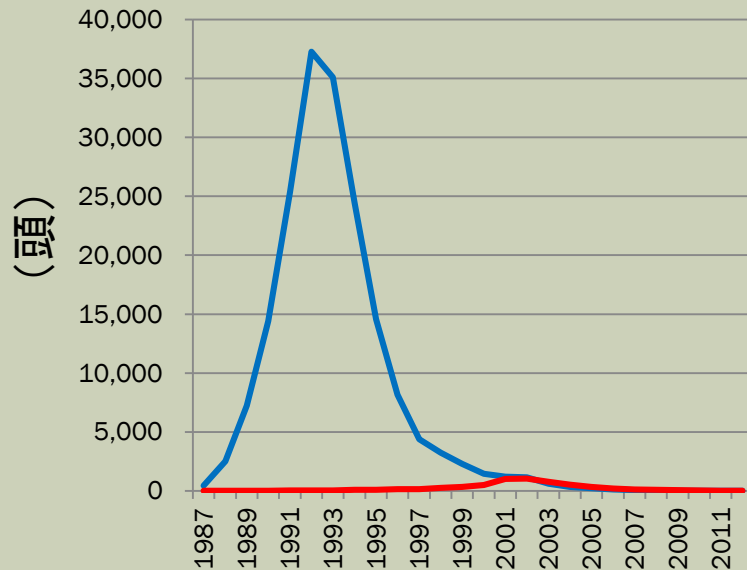
- 牛海綿状脳症（BSE）とは？
- 非定型BSEの発生状況
- 試験研究でわかったこと
- 畜産試験場の取り組み

牛海綿状脳症（BSE）

病原体：	プリオン（Prion）：BSEプリオン
疫学：	<ul style="list-style-type: none">・ 1986年 英国で初めて発見・ 欧州各国、日本、北米に拡散・ BSE感染牛由来の「肉骨粉」飼料等として使用が原因。
症状：	<ul style="list-style-type: none">・ 潜伏期間は平均5～5.5年。・ 神経質、異常歩様、運動失調、外部刺激に過敏反応などの中枢神経症状を呈し、死に至る。
診断：	脳幹部を用いた異常プリオン蛋白質の検出
治療：	治療法は無い。

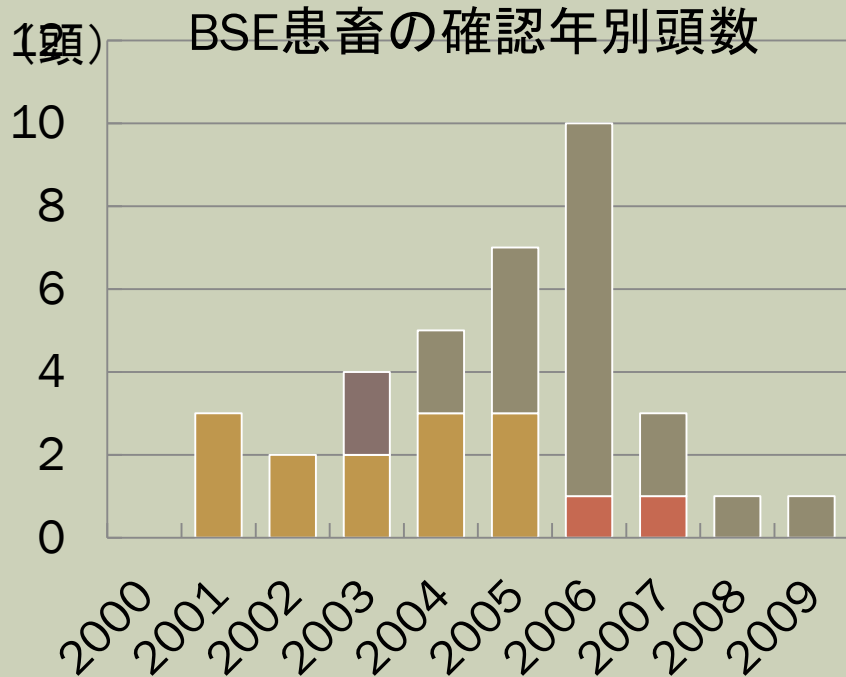


世界のBSEの発生状況



	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
英国	1, 202	1, 144	611	343	225	114	67	37	12	11	7	3
欧州	1, 010	1, 033	772	529	327	199	106	83	56	33	21	16
日本	3	2	4	5	7	10	3	1	1	0	0	0
カナダ	0	0	2	1	1	5	3	4	1	1	1	0
米国	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
ブラジル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

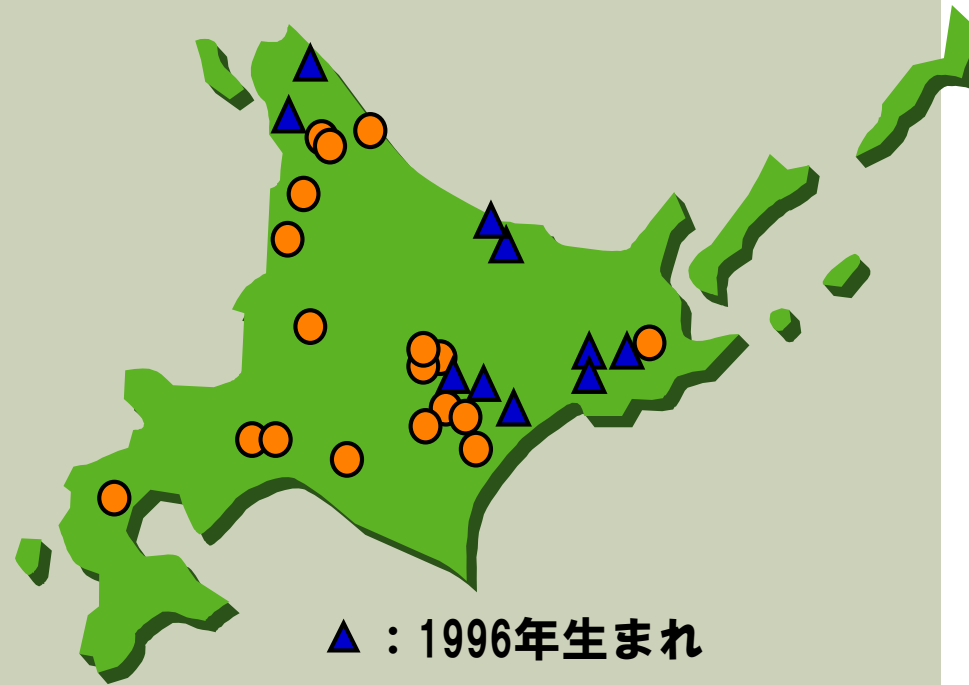
国内BSE発生状況



(患畜確認年)

BSE患畜の生まれ年

- 2001-
- 1999-2001
- 1995-1996
- -1994



▲ : 1996年生まれ

○ : 1999~2001年生まれ

全国36例中北海道産28例

プリオンとは？

プリオン：Prion

Proteinaceous infectious particle: 蛋白質性感染粒子
(ウイルスや細菌などのように病原体の種類の名称)

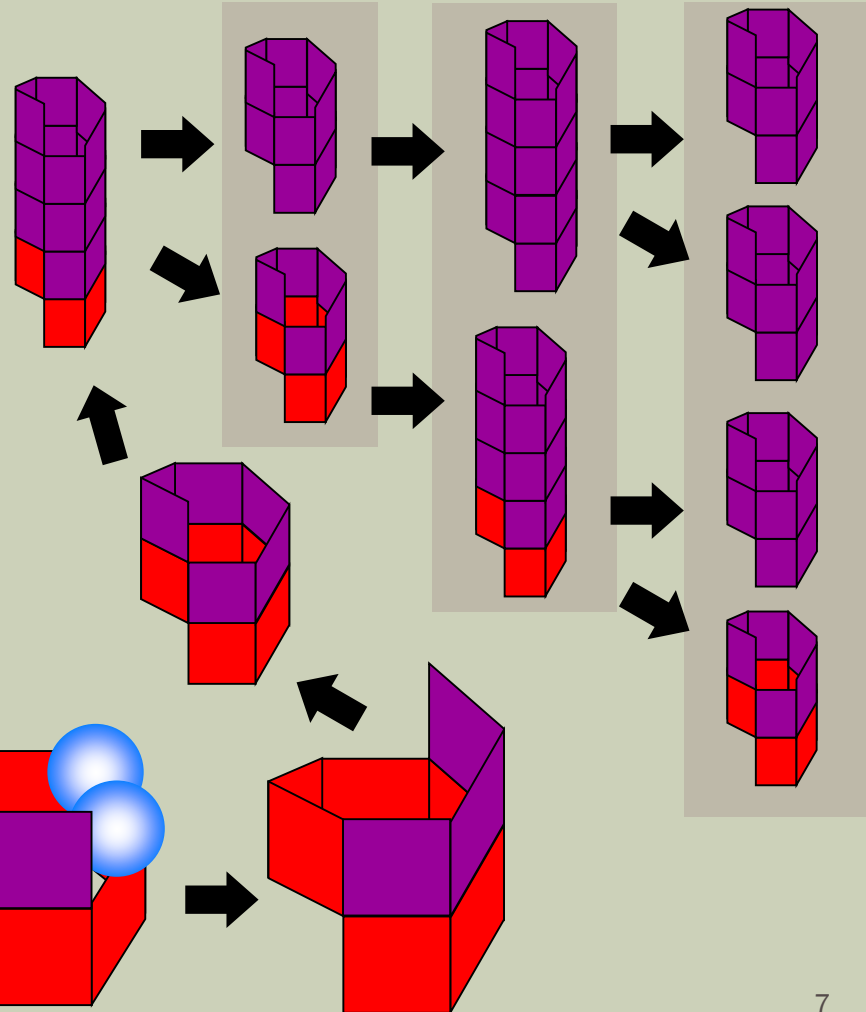
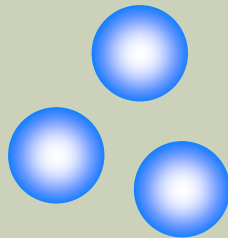
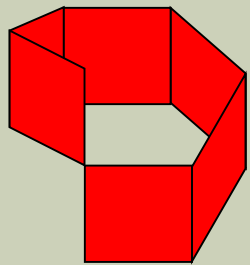
スタンリー・B・プルシナー (米) ノーベル生理医学賞

	プリオン	ウイルス	細菌
細胞構造	なし	なし	あり
核 酸	なし	DNA or RNA	両方
増 殖	正常型を変換	細胞寄生性	自己

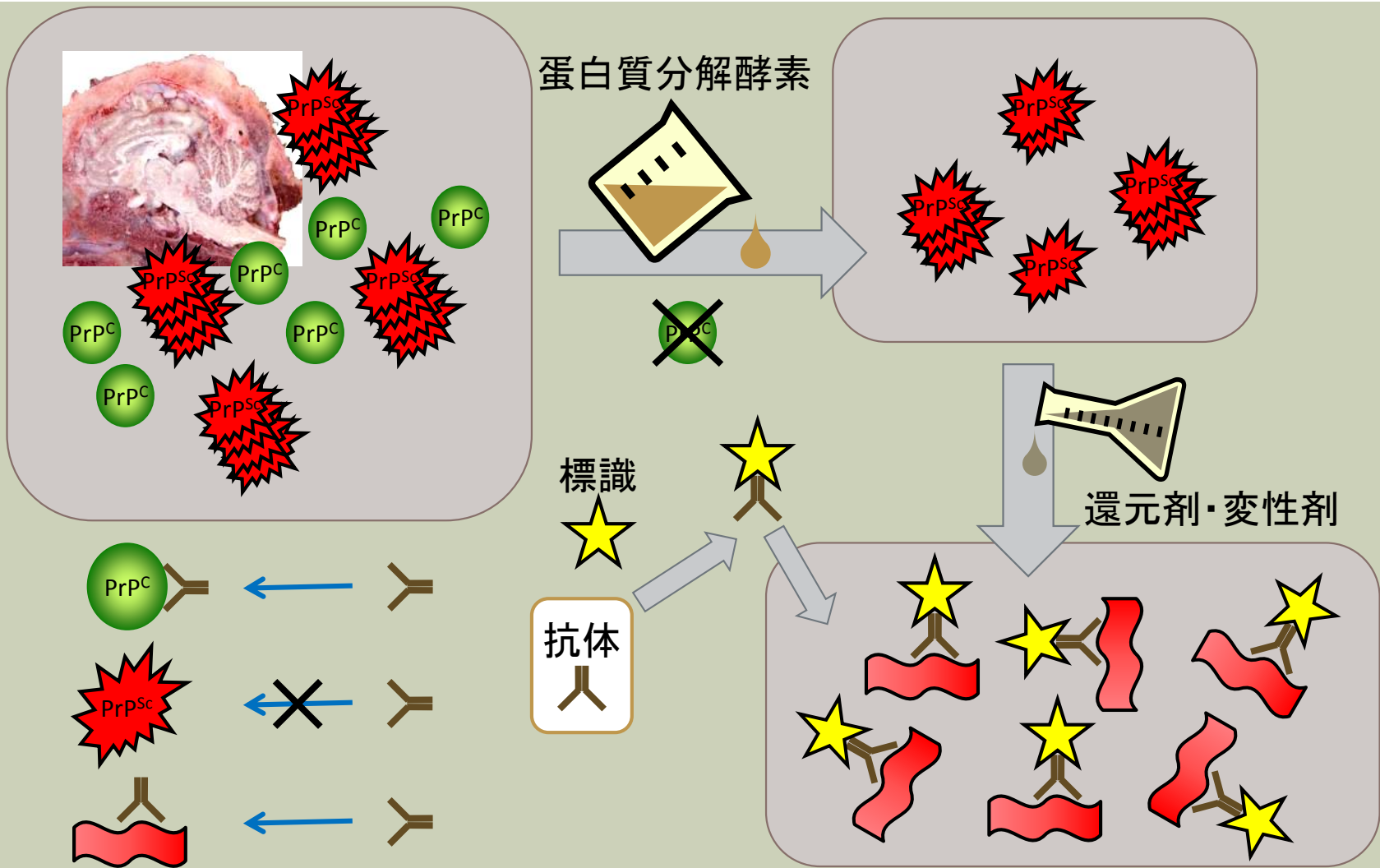
異常プリオン蛋白質の増幅

外来異常型
プリオン蛋白質

自己正常型
プリオン蛋白質



異常プリオン蛋白質の検出



プリオン病

ヒト：クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)

羊：スクレイピー

シカ：慢性消耗症 (CWD)

ミンク：伝達性ミンク脳症 など

***ヒトの変異型CJD**

BSEの異常型プリオン蛋白質と性質が類似し、
牛からヒトへ伝播した可能性が極めて高い

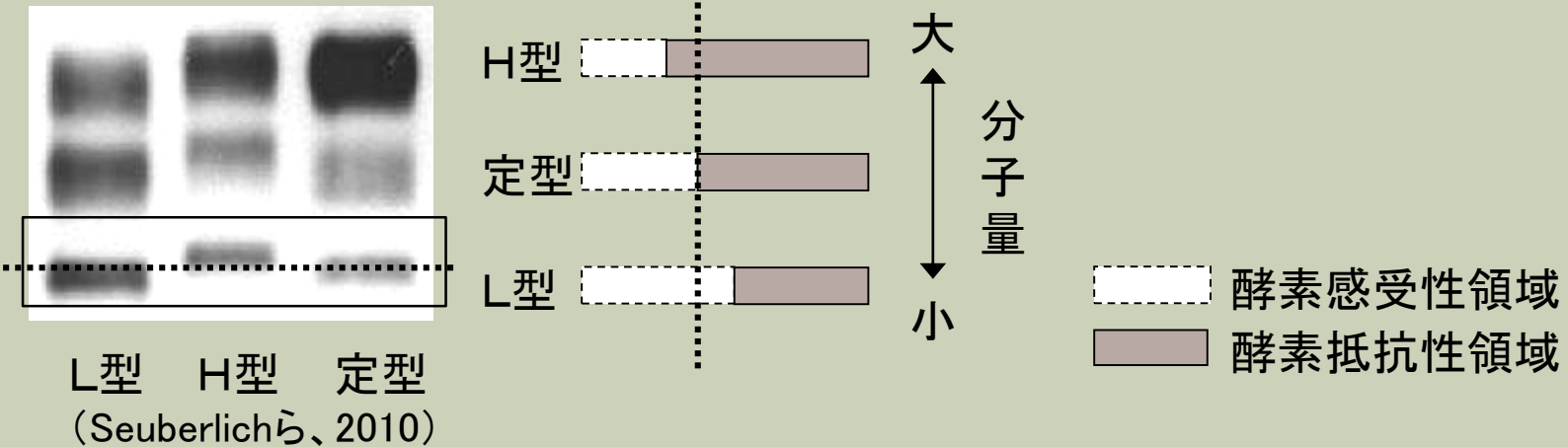
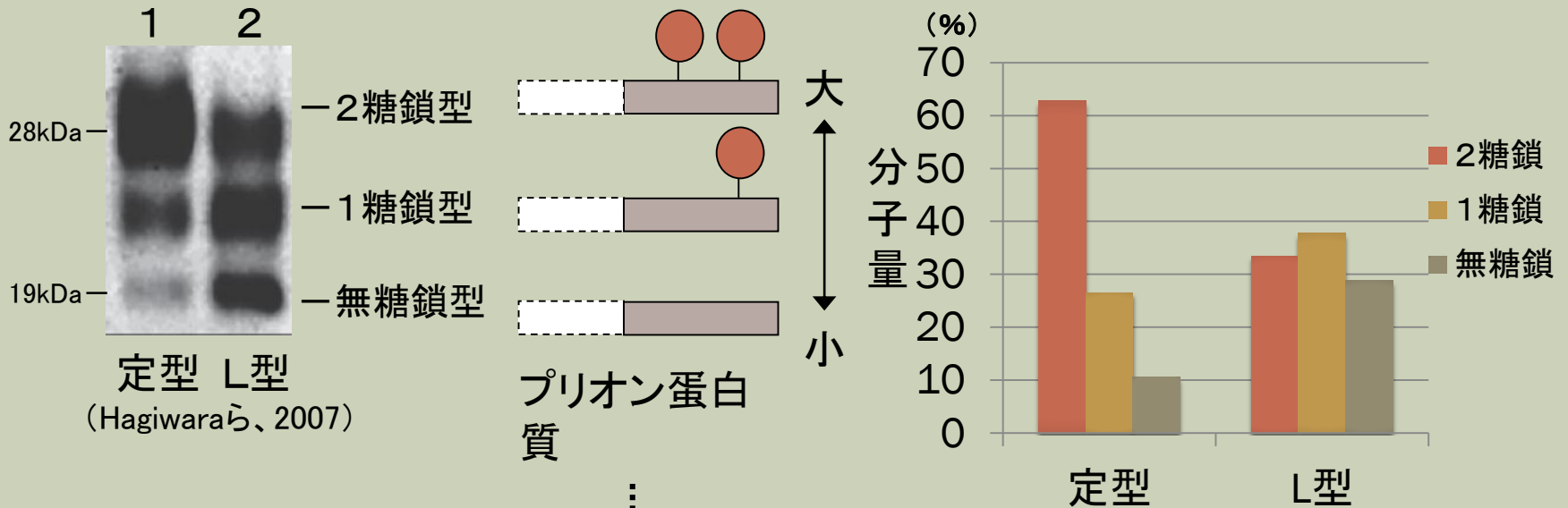
人獣共通感染症として公衆衛生上の問題

非定型BSE

- 非定型BSE： WB法により検出された無糖鎖PrP^{Sc}の分子量及びバンドの位置が定型BSE（C-BSE）と異なるもの。
- C-BSEの無糖鎖PrP^{Sc}に比べ、H型は分子量が大きく、バンドの位置が定型BSEに比べて高く検出され、L型は分子量が小さくバンドの位置が低く検出される。

- 病原体プリオンの特徴は？
- 原因は？
- 発生状況は？
- 牛の症状や診断法は？
- 人に伝播するのか？

非定型BSEの特徴



世界の非定型BSEの発生頭数

国	H-BSE	L-BSE	未分類	合計
オーストラリア	0	2		2
カナダ	1	1		2
デンマーク	0	1		1
フランス	14	13		27
ドイツ	1	1		2
アイルランド	1	0		1
イタリア	0	4		4
日本	0	2		2
ポーランド	2	10		12
スペイン			3	3
スウェーデン	1	0		1
スイス	1	0	2	3
オランダ	1	2		3
ブラジル			※1	1
英国	3	0		3
米国	2	1		3
合計	27	37	6	70

(注: 食品安全委員会資料(～2010分、2012/06/26)に、OIEおよびCDC発表データ(2011～)を追加したもの)
 ※ブラジルの1例については、非定型との発表はなし。

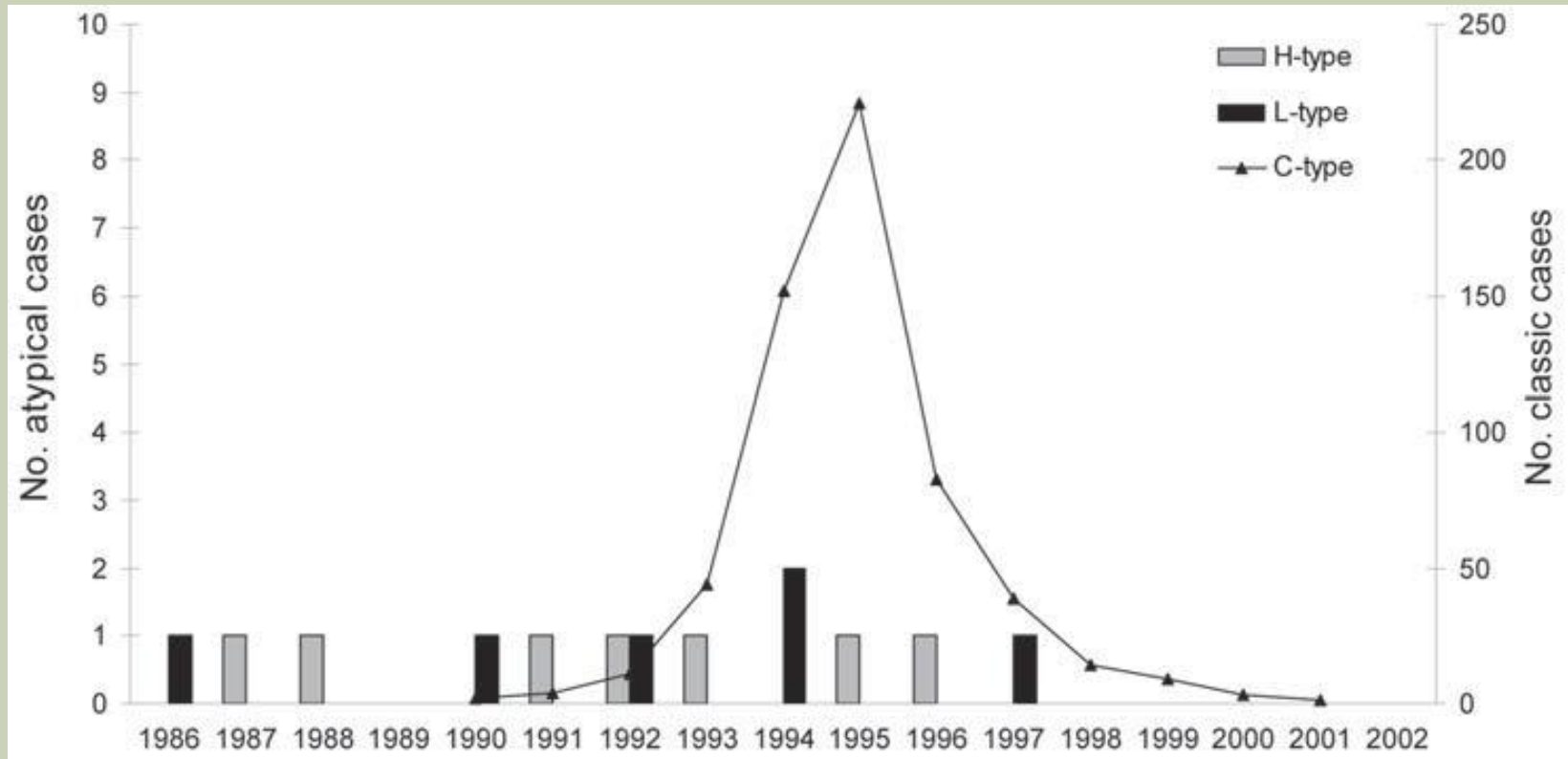
フランスにおけるBSE症例の分類

年	H-BSE	L-BSE	C-BSE	未分類
2001	1	0	153	18
2002	2	1	219	17
2003	3	1	123	10
2004	0	1	51	2
2005	0	1	30	1
2006	0	1	6	0
2007	1	1	2	0
計	7	6	584	48

フランスで確認された645例のBSEについてWBで再分類したところ、13例が非定型BSEと分類された。定型BSEの症例数は減少しているが、非定型BSEは一定の頻度で摘発される(孤発性BSE?)

Biacabe, et al (2008)

フランスで2001～2007年に見つかったBSE 患畜の出生年



フランスで確認されたBSE患畜の出生年。C-BSEは1995年をピークとした傾向がみられるが、非定型BSEに傾向はみられない。

Biacabe, et al (2008)

国内における非定型BSEの発生

発生年月	場所	品種性別	生年月	月齢
2003年 10月	栃木県	ホル種 去勢	2001年 10月	23ヶ月
2006年 3月	長崎県	黒毛和種 雌	1992年 2月	169ヶ月

BSEの試験研究の取組状況

**厚生労働科学研究補助金
食の安全確保推進研究事業**
食品を介する伝達性海綿状脳症
のリスクと対策等に関する研究
(H23~25)

◎北海道大学

国立感染症研究所
動物衛生研究所
医薬基盤研究所
帯広畜産大学
東北大学
徳島大学
長崎大学
道総研 畜産試験場

農林水産技術会議プロジェクト研究
鳥インフルエンザ、BSE、口蹄疫等
の効率的なリスク低減技術の開発
(H20~24)

◎動物衛生研究所

北海道大学
国立感染症研究所
農業生物試験研究所
中央農業総合研究センター
東京医科大学
東北大学
徳島大学
九州大学
長崎大学
道総研 畜産試験場

C-BSEおよびBSE/JP24プリオン接種牛の 潜伏期間と発症期間

Code	品種	接種材料	解剖までの期間(日)	潜伏期間(日)	発症期間(日)
4394	Holstein	C-BSE	610	533	77
4437	Holstein	C-BSE	700	533	167
5087	Holstein	C-BSE	716	577	139
			平均:675 ± 57 ¹⁾	平均:548 ± 25 ¹⁾	平均:128 ± 46 ¹⁾
528	Holstein	BSE/JP24	497	337	160
1061	Holstein	BSE/JP24	476	363	113
5566	Holstein	BSE/JP24	484	333	151
			平均:486 ± 11 ¹⁾	平均: 344 ± 14 ¹⁾	平均:141 ± 25 ¹⁾

1) Mean ± SD

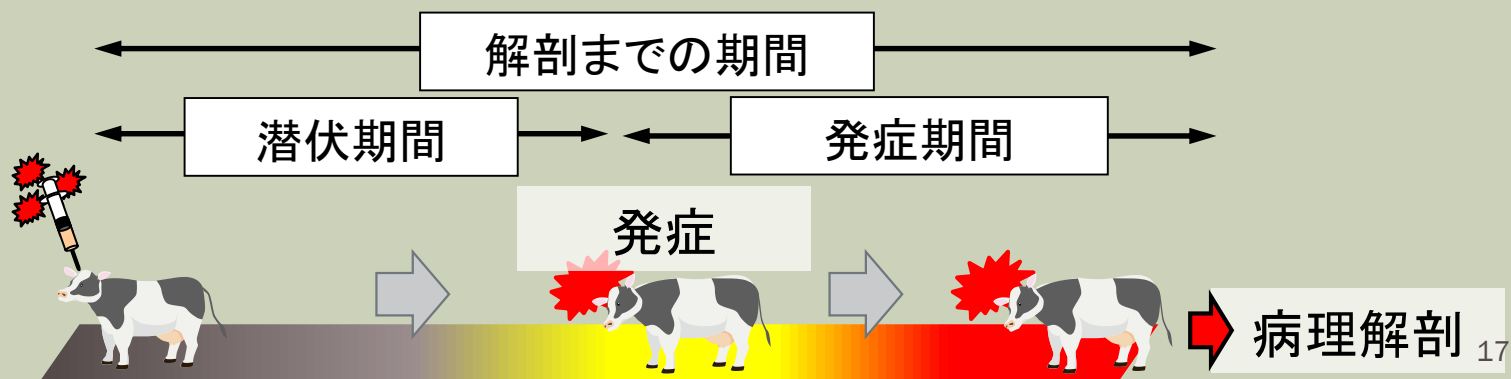


Table 2. Clinical phenotype, incubation period and clinical duration in BSE- and BASE-infected cattle.

Inoculum/ Attack rate	Code/Breed*	Clinical signs at onset	Progression of clinical signs	Incubation period (days)	Clinical duration (days)	
BSE 100%	258-F	Nervousness, hypersensitivity	Apprehension, hypersensitivity to tactile, acoustic and visual stimuli	524	180	
	326-F			660	45	
	329-F			640	150	
				Mean: 608	Mean: 125	
	340-Ab	Nervousness, hypersensitivity	Apprehension, hypersensitivity to tactile, acoustic and visual stimuli	503	120	
	817-Ab			514	180	
	844-Ab			493	60	
				Mean: 503	Mean: 120	
	BASE 100%	254-F	Dullness	Downer cattle	461	10
		259-F	Dullness, amyotrophy	Dullness, amyotrophy, hypersensitivity to facial tactile stimuli	480	60
261-F		470			30	
				Mean: 470	Mean: 33	
816-Ab		Dullness, amyotrophy	Dullness, amyotrophy, hypersensitivity to facial tactile stimuli	551	30	
994-Ab				530	60	
995-Ab				525	105	
	Mean: 535			Mean: 65		

* F denotes Friesian; Ab denotes Alpine brown.

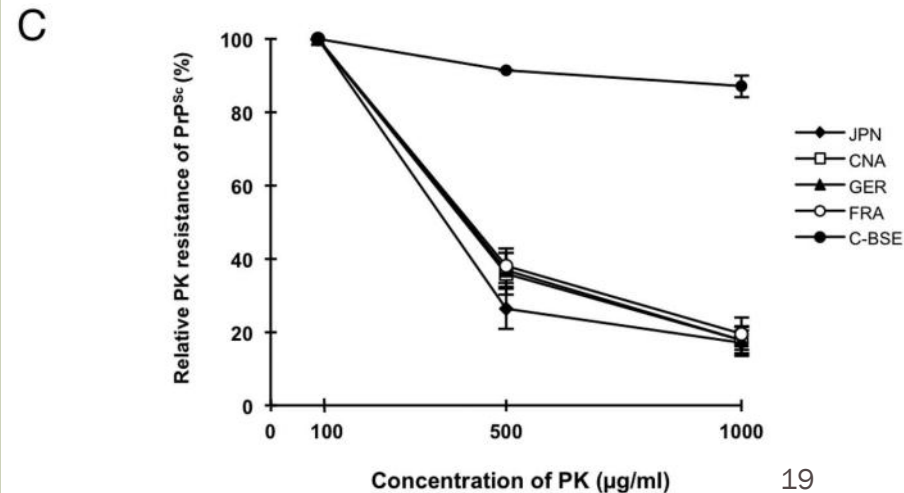
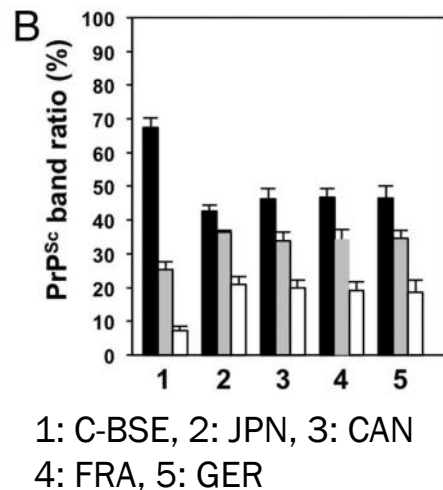
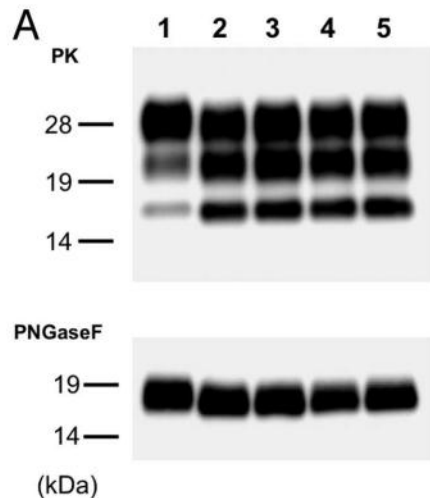
doi:10.1371/journal.ppat.1000075.t002



各国のL-BSEプリオンの比較

	潜伏期間			
	日本	カナダ	ドイツ	フランス
経代 ①	197.7±3.4 (10/10)	172.8±4.0 (12/12)	173.3±3.3 (12/12)	175.7±5.6 (10/10)
経代 ②	152.0±1.7 (24/24)	145.7±1.8 (23/23)	143.1±5.7 (18/18)	143.1±3.9 (18/18)
経代 ③	145.1±3.6 (21/21)	143.7±4.6 (25/25)	145.3±8.6 (12/12)	141.6±4.7 (20/20)

表 牛PrP遺伝子マウス
への脳内接種による潜
伏期間の比較
Masujin, et al. 2012



BSEのサルへの伝達試験

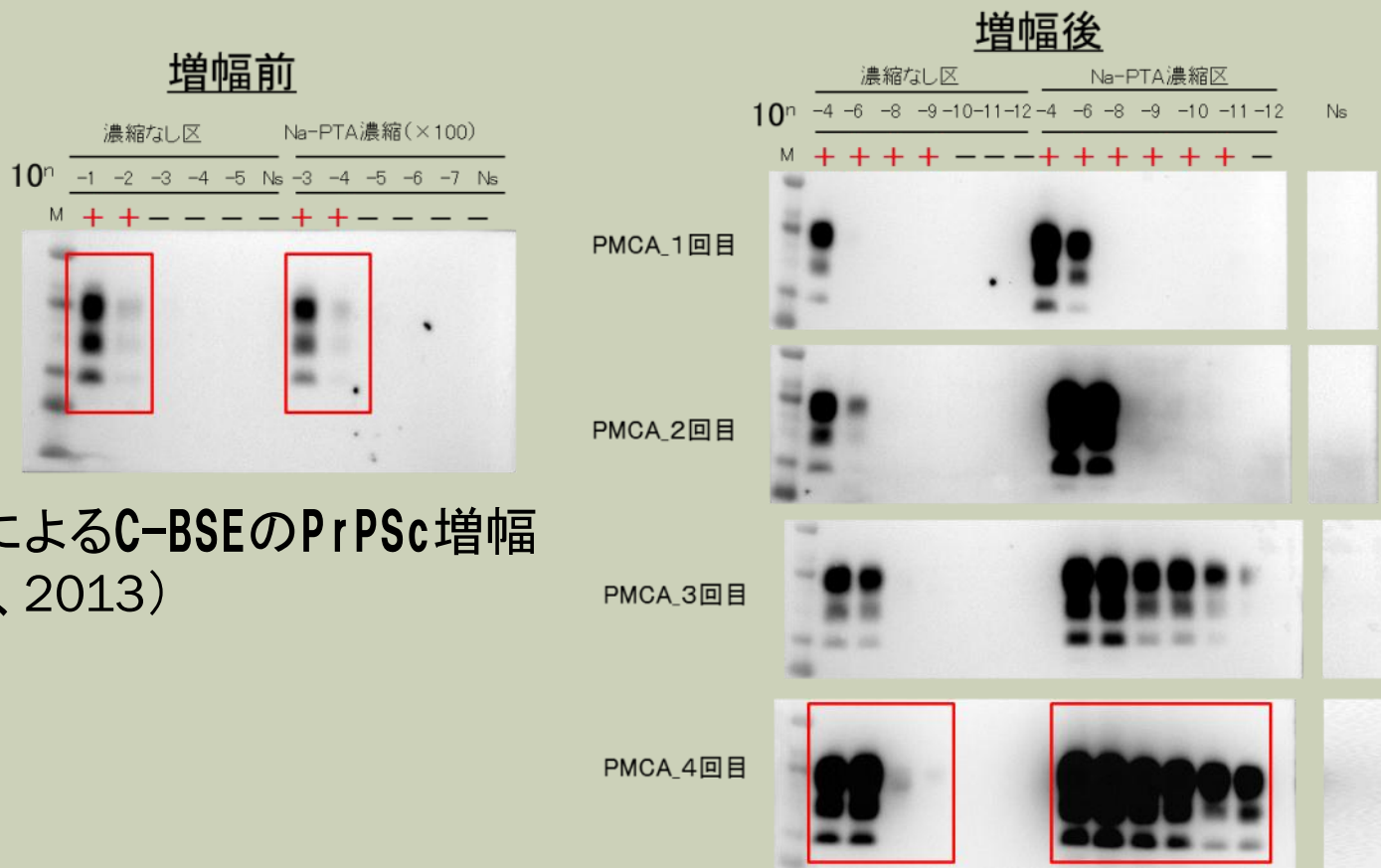
脳内接種	潜伏期間	生存期間
C-BSE	27－44ヶ月	35－59ヶ月
L-BSE	19－20ヶ月	24－25ヶ月

非定型 L-BSEはC-BSEよりも短い潜伏期間でサルへ伝達した。

Ono, et al. 2011

期待される超高感度検出法

- PMCA法：村山ら（動衛研）が定型BSEのPrP^{Sc}増幅法を開発（2010）
- Quic法：新ら（長崎大）がヒトPrP^{Sc}増幅法を開発（2011）



PMCA法によるC-BSEのPrP^{Sc}増幅
(福田ら、2013)

L型非定型BSEの牛への実験感染

目的

BSE/JP24プリオンの特徴を明らかにするため、ホルスタイン種牛にBSE/JP24株の実験感染を行い、臨床経過を調査する。

BSE/JP24株の生化学的および神経病理学的特徴を定型BSEプリオン(C-BSE)と比較する。

方 法

- 供試動物

脳内接種BSEプリオン感染牛

BSE/JP24プリオン接種牛 10頭

C-BSEプリオン接種牛 10頭

脳内接種後、臨床症状を観察、
それぞれ経過毎に病理解剖

- 病理学的解析

□部位・・・大脳、小脳、脳幹部、脊髄

- 免疫組織学的解析

□部位・・・大脳、小脳、脳幹部、脊髄

- ウエスタンブロット法

□部位・・・大脳、小脳、脳幹部

■異常プリオン蛋白質の蓄積

■異常プリオン蛋白質のバンドサイズ

■糖鎖パターンの比率

□その他の部位についても、

異常プリオン蛋白質の蓄積を解析

非定型および定型BSE感染牛の臨床症状の経過

	牛 No.	品種	初発の臨床症状	接種後の月数												解剖前の状態				
				9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	22	23	24
非定型BSE感染	A1 ¹⁾	H	なし	—															症状なし	
	A2 ¹⁾	H	なし	—															症状なし	
	A3 ²⁾	H	(起立困難)	—	—	■													起立不能	
	A4	H	歩様の変化	—	—	—	+												運動失調	
	A5	H	歩様の変化	—	—	—	+	+											運動失調	
	A6	H	音に過剰反応	—	—	+	+	+											運動失調	
	A7 ²⁾	H	(起立困難)	—	—	—	—	—	—	—	■								起立不能	
	A8	B	歩様の変化	—	—	—	—	—	—	+									運動失調	
	A9	B	音に過剰反応	—	—	+	+	+	+	+	+								運動失調	
	A10	B	音に過剰反応	—	—	—	—	—	+	+	+								運動失調	
定型BSE感染牛	C1 ¹⁾	H	なし	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	症状なし	
	C2 ¹⁾	H	なし	—	—	—	□												症状なし	
	C3 ¹⁾	H	なし	—	—	—	—	—	—	—	—	□							症状なし	
	C4 ¹⁾	H	なし	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	□					症状なし	
	C5 ³⁾	H	起立姿勢・歩様の変化	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+			姿勢異常	
	C6	H	起立姿勢・歩様の変化	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	起立不能
	C7	H	歩様の変化	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	起立不能
	C8	B	音に過剰反応	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+				運動失調	
	C9	B	音に過剰反応	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+		運動失調	
	C10 ¹⁾	B	なし	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	症状なし	

* 起立不能等により飼養困難となった非定型BSE感染牛: 8頭(A3~A10)、定型BSE感染牛: 5頭(C5~C9)について比較した。

1)臨床症状が現れる前に試験殺し解剖した

2)臨床症状検査に対する反応が無く、突然起立困難となった

3)臨床症状確認後、接種後20ヶ月にて計画的に病理解剖した。

* 品種H: ホルスタイン種、B: 黒毛和種

* —: 臨床症状無し、+: 臨床症状有り、□: 病理解剖(症状なし)、■白抜き: 病理解剖(症状あり)

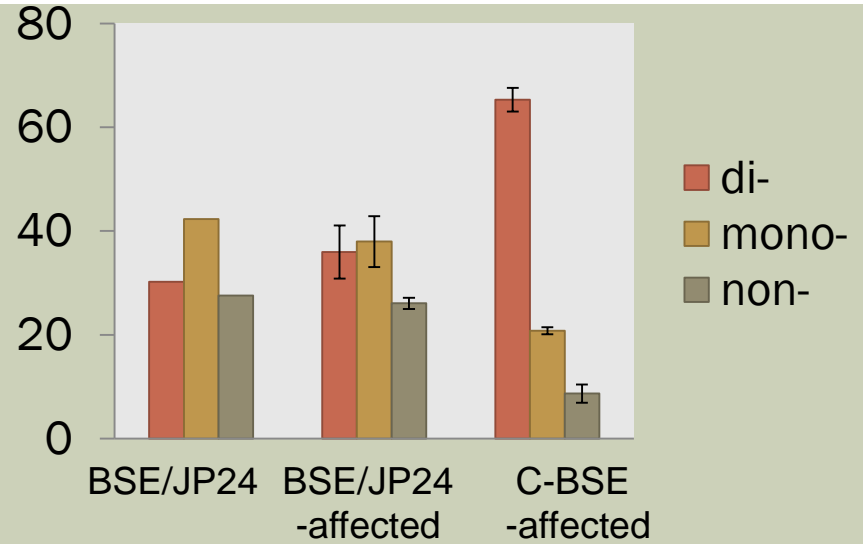
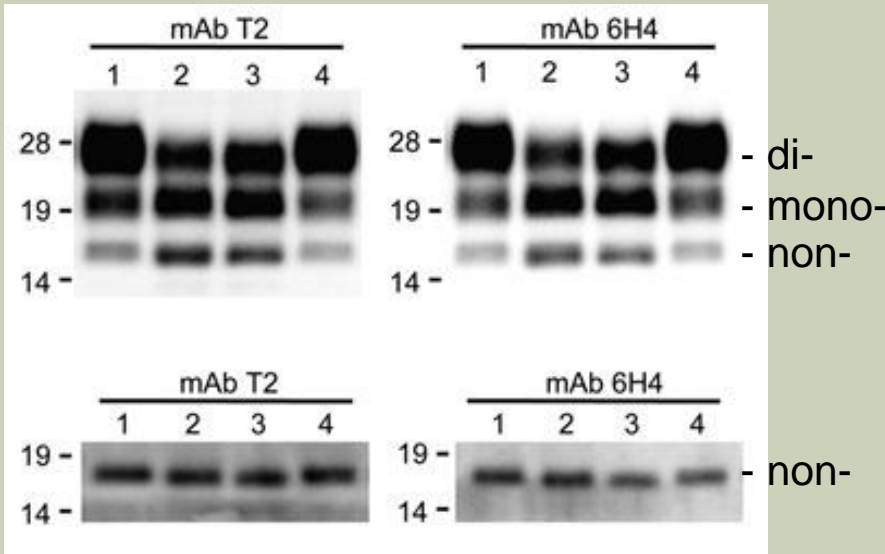
L-およびC-BSE感染牛のBSE臨床症状検査

	牛No.	品種	姿勢・行動	歩様・走行姿勢	聴覚刺激検査	視覚刺激検査
非 定 型 B S E	A3	¹⁾ H	—	—	—	—
	A4	H	—	+	—	—
	A5	H	—	+	—	—
	A6	H	—	—	+	—
	A7	¹⁾ H	—	—	—	—
	A8	B	—	+	—	—
	A9	B	—	—	+	—
	A10	B	—	—	+	—
定 型 B S E	C5	H	+	+	+	+
	C6	H	+	+	+	+
	C7	H	+	+	+	+
	C8	B	+	—	+	—
	C9	B	—	—	+	—

1) 臨床症状検査に対する反応が無く、突然起立困難となった。

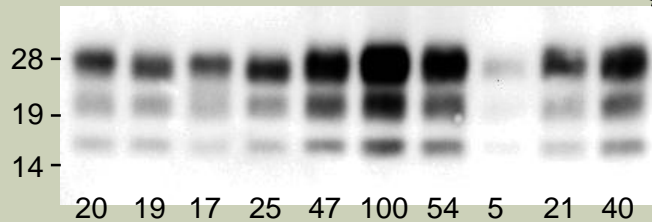
H：ホルスタイン種、B：黒毛和種

非定型BSEの特徴



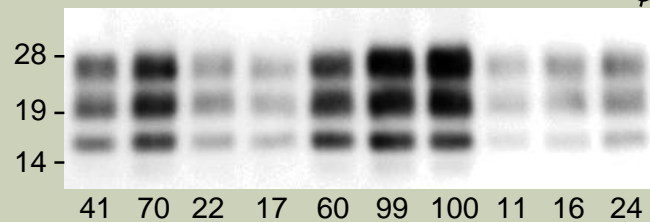
C-BSE-affected

嗅球 前頭皮質 梨状皮質 海馬 被殻 視床 視床下部 小脳皮質 小脳髄質 延髄門部



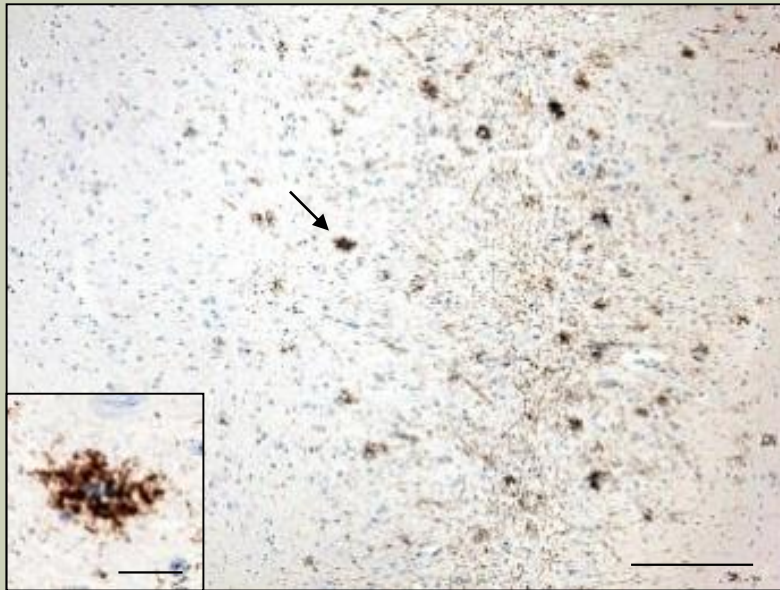
BSE/JP24-affected

嗅球 前頭皮質 梨状皮質 海馬 被殻 視床 視床下部 小脳皮質 小脳髄質 延髄門部

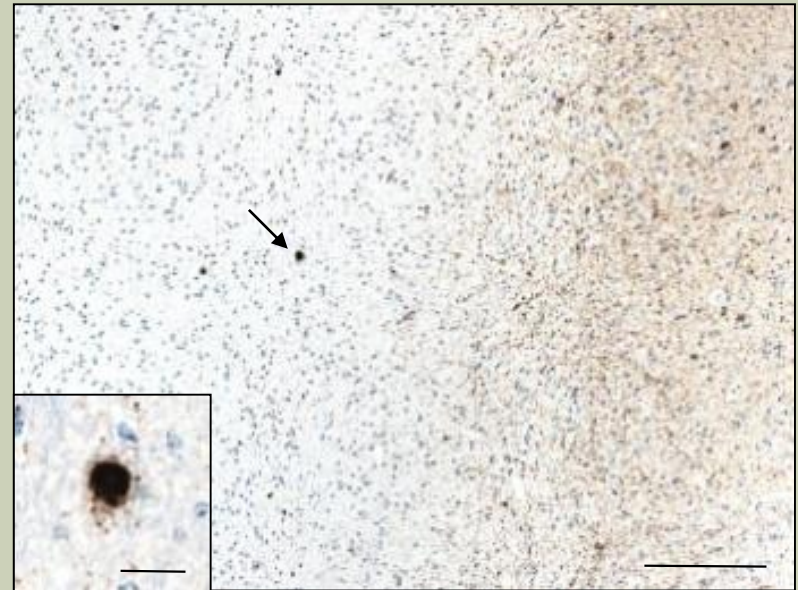


免疫組織学的解析の比較

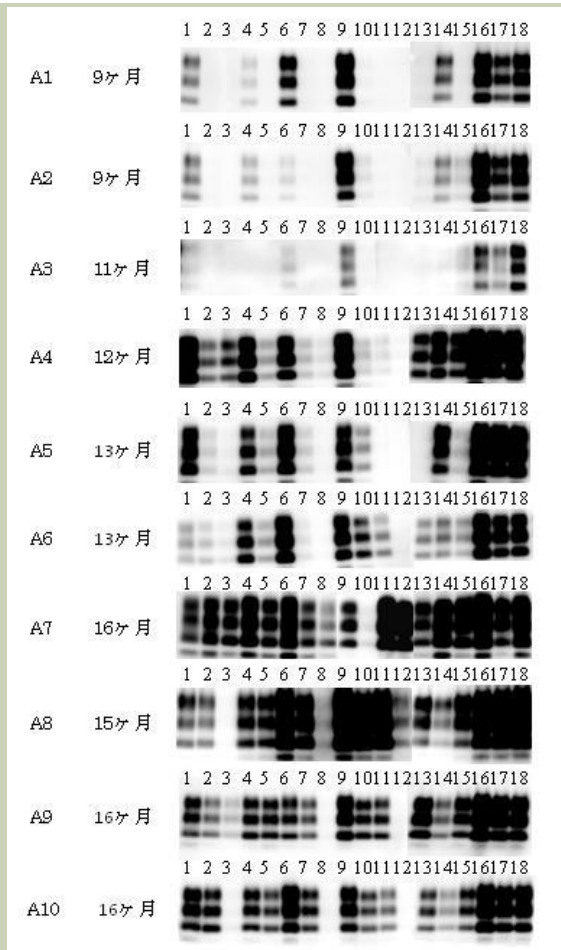
C-BSE



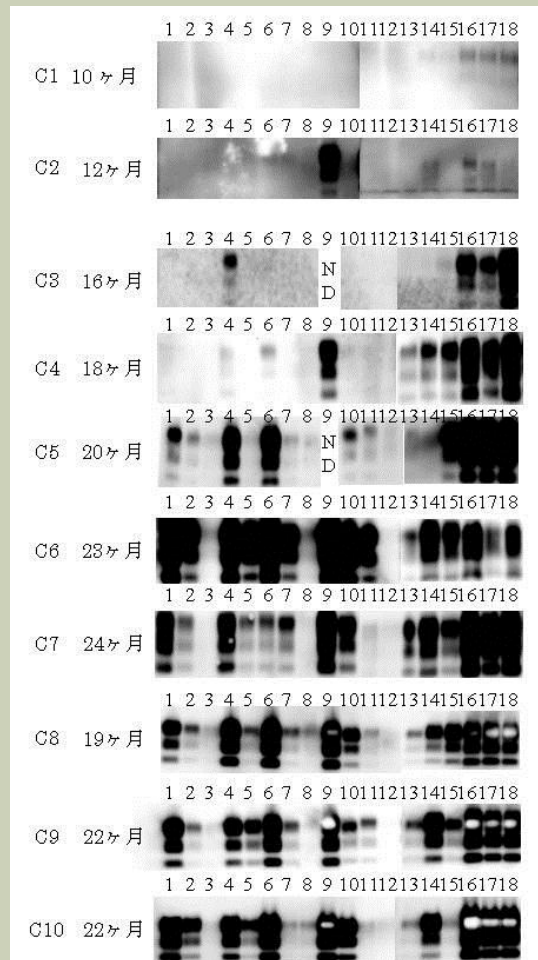
BSE /JP24



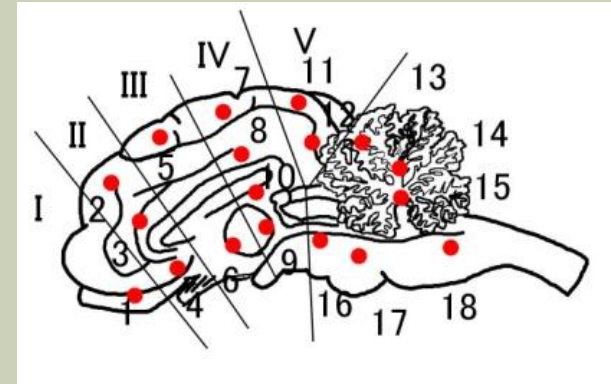
L-およびC-BSE感染牛の脳組織におけるPrP^{Sc}分布



L-BSE



C-BSE



- 脳 I : 1前頭部
- 脳 II : 2上部、3髄質、4線条体
- 脳 III : 5頭頂部、6視床
- 脳 IV : 7頭頂部、8髄質、9視床、10海馬
- 脳 V : 11後頭部上部、12後頭部下部
- 小脳 : 13皮質、14白質、15小脳脚
- 脳幹部 : 16中脳、17橋、18延髄門部

L-およびC-BSE感染牛の末梢組織におけるPrP^{Sc}検出

牛No.	接種後の 月数	脊柱				頭部					頸部				体幹				四肢						
		脊髄神経節頸膨大	脊髄神経節腰膨大	馬尾	尾骨神経	下垂体	視神経	網膜	顔面神経	舌下神経	三叉神経節	前頸神経節	中頸神経節	迷走神経	副神経	交感神経幹	星状神経節	横隔神経	腹腔神経節	腕神経叢	肩甲上神経	正中神経	橈骨神経	坐骨神経	腓骨神経
A1	¹⁾ 9	-	+			-	+		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	¹⁾ 9	-	-	-	-	-	+		-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	11	-	-	-		+	+	+	+		+		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A4	12	+		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
A5	13	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+		-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A6	13	+	+	+		-	+	+	-	-	+		+		+				-	-	-		+	-	-
A7	16	+	+	+	+	+	+		+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-		-	-	-
C3	¹⁾ 16	+	-	+		+	-	-	-	-	+		+		-	-	-		-	-			-	-	-
C4	¹⁾ 18	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
C5	20	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
C6	23	+	+	-	-	+	+	+	+		+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
C7	24	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-

非定型BSEと定型BSEの比較

	発現時期（月）		臨床症状	プリオンの蓄積			プリオンの病原性 ³⁾
				時期（月）	部位		
	臨床症状	飼育困難		脳組織全域	脳組織 ¹⁾	末梢組織 ²⁾	
非定型BSE	11～16	11～16	不明瞭	12	全域	遠心性	強
定型BSE	18～21	19～24	明瞭	19	全域	遠心性	—
1) 全域：飼育困難になった時点では非定型および定型ともに脳組織のほぼ全域にプリオンが蓄積した。							
2) 遠心性：非定型および定型ともに頭部から体幹、四肢へと遠心性にプリオンが伝播した。							
3) 定型プリオンとの比較							

まとめ

日本で確認されたL-BSEであるBSE/JP24の特徴を明らかにするため、BSE/JP24症例の脳乳剤を牛に接種し、病気の臨床経過に加え、生化学的および神経病理学的特徴を調査した。

BSE/JP24分離株はホルスタイン種牛に伝達した。

潜伏期間、神経病理学的特徴および宿主の異常プリオンタンパク質の分子的性質から、BSE/JP24プリオンの性質は、従来型BSEプリオンから明らかに区別された。

BSE/JP24プリオンは、イタリアで見つかった牛アミロイド性海綿状脳症に酷似している。

非定型BSEとは？

	定型BSE	非定型BSE	
	C-BSE	L-BSE	H-BSE
病原体	定型	L型	H型
疫学	<ul style="list-style-type: none"> • 英国で発見 • 世界各国に拡散 • 「肉骨粉」等が原因。 	<ul style="list-style-type: none"> • イタリアで初発例 • 世界各国で散発 • 原因不明、孤発性の可能性 	
症状	<ul style="list-style-type: none"> • 潜伏期間は平均5～5.5年 • 中枢神経症状、死に至る 	<ul style="list-style-type: none"> • 野外例では高齢牛 • 脳内接種でC-より早い（L） • 症状が異なる、不明瞭 	
診断	<ul style="list-style-type: none"> • 脳幹部からPrP^{Sc}検出 	<ul style="list-style-type: none"> ◇脳幹部からPrP^{Sc}検出 	
人への感染性	<ul style="list-style-type: none"> • 変異型CJDを強く示唆 	<ul style="list-style-type: none"> • 脳内接種では、牛の他、ヒト型マウス、サルに感染 • 経口接種は不明 	

今後の研究の展開

- 定型BSE → 発生は終息傾向。今後もサーベイランスは必要。
非定型BSE → ほとんど老齢牛で発生。孤発性の可能性？
牛、人に対する病原性が強い。

～これからの対策～

- ・ 反芻獣由来の動物性蛋白質飼料の牛への給与禁止 → 継続
- ・ BSE検査の継続 → 現行の検査は非定型BSEの診断も可能
老齢牛、死亡牛、高リスク牛、・・・
- ・ SRM除去 → BSE検査でカバーできないリスクの排除
- ・ 研究の継続・・・リスク評価のための基礎的知見の集積
非定型BSEプリオンの起源
プリオン分布・発病機構
プリオン発生のメカニズム



BSE対策のロードマップの必要性