

わが国における非定型スクレイピーのレトロスペクティブな調査

吉田 歩¹⁾, 舩甚賢太郎²⁾, 今村守一²⁾, 岩丸祥史²⁾, 毛利資郎²⁾, 横山 隆^{2)*}

(平成19年7月9日 受付)

Retrospective surveillance of atypical scrapie in Japan

Ayumu YOSHIDA¹⁾, Kentaro MASUJIN²⁾, Morikazu IMAMURA²⁾, Yoshifumi IWAMARU²⁾,
Shirou MOHRI²⁾ & Takashi YOKOYAMA^{2)*}

近年、ヨーロッパ各国において非定型スクレイピー症例の増加が報告されている。非定型スクレイピーは、脳内に蓄積する異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蛋白質分解酵素抵抗性が弱く、その分布も従来のスクレイピーとは異なっている。本研究では、欧州で非定型スクレイピーの検出に応用されている固相酵素免疫測定法 (ELISA) キットを用いて、過去4年間に伝達性海綿状脳症 (TSE) サーベイランスで検査された羊・山羊835検体の調査を実施した。その結果、わが国への非定型スクレイピーの侵入は確認されなかったが、羊171検体のプリオン蛋白質のアミノ酸多型を調べたところ、その多くが非定型スクレイピーに感受性を示す遺伝子型であることが示された。このことから、非定型スクレイピーの摘発も含めたサーベイランス手法の検討が必要と考えられた。

緒 言

スクレイピーは脱毛、搔痒症を主徴とする羊・山羊の致死性の中樞神経系変性疾患である²¹⁾。本病は、牛海綿状脳症 (BSE)、シカの慢性消耗病 (CWD) などとともに伝達性海綿状脳症 (TSE) に分類され、わが国の家畜伝染病予防法では法定伝染病に指定されている。感染動物には長い潜伏期の後に、中樞神経系に空胞変性と異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積が認められる²¹⁾。PrP^{Sc}は宿主のプリオン蛋白質遺伝子 (*PRNP*) にコードされる正常プリオン蛋白質 (PrP^C) の構造異性体であり¹⁾、

両者は蛋白質分解酵素 (PK) 抵抗性の有無により区別されている²¹⁾。PrP^{Sc}はTSEにおける唯一の疾病特異マーカーであり、その検出により診断が行われている²¹⁾。わが国では2001年のBSEの発生を受けて、BSE検査の実施に加えて、羊・山羊、シカを対象としたTSEサーベイランスも強化された (農林水産省TSE検査対応マニュアル平成15年6月17日)。

非定型スクレイピー (Nor98) は1988年ノルウェーで初発例が報告され³⁾、ヨーロッパ各国で発生が報告されている^{4-5, 8-9, 19)}。非定型スクレイピーに感染した羊は、搔痒症など従来のスクレイピー (定型スクレイピー) に特徴的な臨床症状を示さず、脳内に蓄積するPrP^{Sc}の蛋白質分解酵素 (プロテイナーゼK: PK) 抵抗性も弱く、PrP^{Sc}の脳内の分布も定型スクレイピーとは異なっている。定型スクレイピーを対象とした脳幹部の免疫組織化学 (IHC) やウエスタンブロット (WB) では摘発できない例があることも知られている^{4, 8)}。

欧州では、BSE拡大の原因となった肉骨粉を含む動物

1) 茨城大学

2) 動物衛生研究所プリオン病研究センター

* Corresponding author; Mailing address: Takashi YOKOYAMA, Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, JAPAN
Tel & Fax : +81-29-838-7757
E-mail : tyoko@affrc.go.jp

性蛋白質飼料が、牛に加えて羊・山羊にも給餌されていたことから、羊・山羊へのBSEの伝達が懸念されている²⁾。そこで、BSE迅速診断キットの羊・山羊の検査への応用性が検討され^{7, 20)}、数社の固相酵素免疫測定法 (ELISA) キットは、非定型スクレイピーも含めた羊・山羊の検査に利用されている。

わが国のTSEサーベイランスでは、12ヶ月齢以上の農場で死亡した羊・山羊についてスクレイピー感染の有無が検査されている。現行のTSEサーベイランス事業では定型スクレイピーを対象とした検査方法が応用されており、わが国における非定型スクレイピーの現状については明らかではない。

そこで、過去4年間に行われたTSEサーベイランスの検体について、ELISAキットを用いて、レトロスペクティブに非定型スクレイピーの有無を調査した。

これまでの研究から、プリオン蛋白質 (PrP) のアミノ酸多型がスクレイピー感受性に影響することが明らかになっており¹³⁾、摘発された非定型スクレイピー羊の多くは定型スクレイピーに抵抗性と考えられるアミノ酸多型を示している^{15, 22)}。非定型スクレイピーが蔓延する危険性の有無を検討するには、わが国の羊のPrP遺伝子型を解析し、感受性集団の比率を明らかにすることが重要である。そこで、羊の検体についてPrP遺伝子型の調査も実施した。

材料と方法

検体

2003年4月1日から2006年12月31日までの期間に、農林水産省が実施するTSEサーベイランス事業で集められた羊332頭、山羊503頭 (計835頭) の延髄 (門部) を供試した。これらの試料はすべて12ヶ月齢以上の死亡家畜から採取され、WBで定型スクレイピーの陰性を確認した後、-20℃に保存されていた²³⁾。羊・山羊の死亡時の年齢はTSEサーベイランス検体調書に基づいて区分した (表1)。

Table 1 Age distribution of examined sheep and goats and their ELISA results

	age of examined sheep and goat(year) ¹⁾					ELISA ²⁾	
	1-3	4-6	7-9	>10	Unknown	+	-
2003	76	39	26	21	16	0	178
2004	85	47	38	31	16	0	217
2005	103	60	28	27	20	0	238
2006	92	50	28	26	6	0	202
Total	356	196	120	105	58	0	835

¹⁾ Numbers of examined sheep and goats

²⁾ Result of TeSeE BSE test

ELISA

市販のELISAキット (TeSeE, Bio-Rad) を使用した。ELISAは添付のマニュアルに従って実施した。本キットはBSE診断用として開発されたが^{10, 17)}、欧州委員会での評価結果によれば、定型スクレイピー、非定型スクレイピー (Nor98)、BSE羊への有用性も報告されている^{7, 20)}。また本キットは、わが国のBSE検査での承認も得られている。検査精度の向上のため、わが国では未承認であるが、欧州で羊、山羊のTSE検査に用いられているTeSeE sheep/goatキット (Bio-Rad) も併用した。

PrP遺伝子型の解析

2005年4月～2006年12月の間に検査に供された羊サンプル171検体について、PrP遺伝子型の解析を行った。ゲノムDNAは、各検体の脳組織より市販キット (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen) を用いて抽出した。ゲノムDNAを鋳型として、プライマー 68F: 5'-TCTGCAAGAAGCGACCAAAACC-3' および 580R: 5'-TGGTGACTGTGTGTTGCTTGAC-3' を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により512bpのPRNP遺伝子断片を増幅し、ダイレクトシーケンズ反応により増幅産物の塩基配列を決定した。得られた配列からPrPのアミノ酸配列を推定した²³⁾。

結 果

1) ELISA

2003年から2006年にかけてTSEサーベイランスに供された835検体の羊、山羊のうち、1～3才: 356頭、4～6才: 196頭、7～9才: 120頭、10才以上: 105頭、年齢不詳: 58頭について検査を行った。年齢不詳の個体を除く777頭の平均年齢は5.3才であった。検査した835例はすべてTeSeE ELISAキットで陰性であった (表1)。同検体はTeSeE sheep/goatキットでも陰性であった (結果は示さず)。

2) PrPアミノ酸多型

2005年4月～2006年12月の間に採取された羊サンプル171検体の遺伝子型は表2に示したとおりである。スクレイピーの感受性に影響することが知られているコドン136,154,171のアミノ酸多型による羊の遺伝子型はARR/ARQ, ARQ/ARQ, ARR/ARRがそれぞれ43.3, 36.3, 12.3%であった。欧州で非定型スクレイピーが確認された遺伝子型の羊 (表2, +または±) は、165/171 (96.5%) を示した。また、18/171 (10.5%) の羊に141Fのアミノ

Table 2 PrP genotype of examined sheep

PrP genotype of 136, 154, 171 ¹	numbers (%)		susceptibility of atypical scrapie ²	PrP141 ³		
				LL	LF	FF
ARR/ARR	20	(12.3)	+	20	-	-
ARR/ARQ	74	(43.3)	+	65	9	-
ARR/AHQ	2	(1.2)	+	2	-	-
ARQ/AHQ	6	(3.5)	+	3	3	-
ARQ/ARQ	62	(36.3)	+	56	5	1
ARQ/VRQ	1	(0.6)	±	1	-	-
ARR/VRQ	1	(0.6)	-	1	-	-
ARQ/ARH	1	(0.6)	-	1	-	-
VRQ/VRQ	4	(2.0)	-	4	-	-
Total	171			153	17	1

¹ PrP genotype at codons 136, 154 and 171. A, Alanine; R, Arginine; Q, Glutamine; H, Histidine; V, Valine.

² Susceptibility of atypical scrapie was classified as +, ±, -¹⁰.

³ PrP amino acid polymorphisms at codon 141. L, Leucine; F, Phenylalanine.

酸多型が認められた。

考 察

わが国には約1.6万頭の羊および約2.9万頭の山羊が飼養されており（農林水産省平成15年家畜衛生統計）、定型スクレイピーの散発的な発生が確認されているが²³⁾、非定型スクレイピーの発生は確認されていない。これまでの報告で、非定型スクレイピーの臨床症状として体重減少や進行性の運動失調、衰弱、歩行異常などが知られている^{3, 18)}。一方、明瞭な症状を伴わない健康と畜での摘発例も増加しており、サーベイランスの必要性も示唆されている²²⁾。

定型スクレイピー由来またはBSE由来のPrP^{Sc}はPK処理によりPrP27-30またはPrPcoreと呼ばれるPK抵抗性のフラグメントに収束する¹²⁾。非定型スクレイピー由来のPrP^{Sc}はPK抵抗性が弱く、ウエスタンブロットでのPK処理後に残るPrPフラグメントのバンドパターンもPrP27-30とは異なることが知られている^{11, 14)}。したがって、定型スクレイピーの検査で用いられるPK処理の条件では、非定型スクレイピー由来PrP^{Sc}は高率に分解される⁸⁾。TeSeE ELISAキットは2種類の抗PrPモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAであるが、一方の抗体はPrP27-30では消失してしまうオクタリプト領域をエピトープとして認識している。従って、このELISAでは、全長のPrP^{Sc}を精製して検出を行っている。一般にTSEの診断に用いられる抗PrP抗体はPrP^CおよびPrP^{Sc}の両者と反応する。本キットでは37°C 10分という短時間のPK処理により、PrP^{Sc}は消化せず、非特異反応の原因となるPrP^Cを除去している。ほぼ全長のPrP^{Sc}が残存することが、本キットによる非定

型スクレイピーの摘発が可能な理由となっている。

一方、非定型スクレイピーのPrP^{Sc}は脳幹部よりも小脳に多く分布するため³⁾、欧州では大孔法で小脳をサンプリングするためのスプーンも活用されている。今回の調査は、過去のTSEサーベイランス後の保存サンプルである延髄を材料としたが、英国で行われた同様の調査でも、TeSeE ELISAキットにより、非定型スクレイピーが高率に摘発されている⁸⁾。延髄を用いた調査でも非定型スクレイピーの摘発が可能であること、ノルウェーで認められた非定型スクレイピーの羊は約4～6才であったこと、今回の調査対象の平均年齢が5.3才であったことから、今回の結果は、わが国の羊、山羊が非定型スクレイピーの浸潤を受けていないことを示唆するものである。

国内で承認されているBSE診断キットは牛用としての承認しか得られていないため、羊、山羊の検査への使用には制限がある。現行のTSEサーベイランスは主にWB、IHCで検査が行われている²³⁾。非定型スクレイピーの確定検査のための、採材部位およびWBでのPK処理条件の検討が必要である。一方で、効率的な浸潤調査のためには、スクリーニング検査としてのELISAの導入が有効である。

羊PrPのアミノ酸多型がスクレイピーの感受性に影響することが報告されている¹³⁾。PrPのコードン136, 154, 171がVRQ/VRQの羊は定型スクレイピーに最も感受性を示し、ARR/ARRの羊は抵抗性を示す¹³⁾。そこで、TSE羊のリスクを排除する目的で選抜育種によるスクレイピー抵抗性羊群の作出の取り組みも行われている⁶⁾。しかし、非定型スクレイピーは、従来、抵抗性と考えられていた遺伝子型の羊に高い感受性があり^{8-9, 15-16, 18-19)}、選抜育種によるスクレ

イビーの清浄化対策の障害となっている。PrP 遺伝子型の解析により、わが国の羊の多くが非定型スクレイピーに感受性と考えられている遺伝子型を保有することが示唆された(表2)。非定型スクレイピーの52.6%が141番目のコドンがLFまたはFFを保有しているとの報告もあり、本アミノ酸多型の非定型スクレイピーに対する感受性への影響も示唆されている¹⁶⁾。調査した羊の10.5%に141LFまたはFFを持つ個体が存在し(表2)、今後も遺伝子型の推移に関する調査が必要である。

非定型スクレイピーの羊間での伝達様式ならびにヒトへのリスクについては明らかにされていないが、欧州でその発生数が増加しており、わが国の羊群の多くが本病に対して感受性の遺伝子型を保有していることから、今後のTSEサーベイランス事業では、非定型スクレイピーの摘発も可能とした手法の導入が必要と考えられる。

謝 辞

本研究は、平成18年度農林水産省「人畜共通感染症等危機管理体制整備調査等委託事業」および農林水産省委託プロジェクト研究「BSE等動物プリオン病の制圧のための技術開発」の助成を受けて行った。論文の校閲を頂いた動物衛生研究所の筒井俊之博士、TeSeE Sheep/goatキットの輸入にご協力頂いた日本バイオラッド株式会社の杉村健志氏、北村明子氏および動物衛生研究所プリオン病研究センターの職員の皆様に深謝致します。

引用文献

- 1) Basler, K., Oesch, B., Scott, M., et al.: Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417–428 (1986).
- 2) Bellworthy, S. J., Dexter, G., Stack, M., et al.: Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Vet. Rec.* 157, 206 (2005).
- 3) Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., et al.: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* 153, 202–208 (2003).
- 4) Buschmann, A., Lühken, G., Schultz, J., et al.: Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP^{ARR/ARR}). *J. Gen. Virol.* 85, 2727–2733 (2004).
- 5) De Bosschere, H., Roels, S., Benestad, S. L., et al.: Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet. Rec.* 155, 707–708

- (2004).
- 6) Defra. National scrapie plan for Great Britain, NSP Programme brief. January 2003.
<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/nsp/index.html>. 2005.
- 7) EFSA. Scientific report of the European food safety authority on the evaluation of rapid post mortem TSE tests intended for small ruminants. EFSA Scientific report. 31, 1–17 (2005).
- 8) Everest, S. J., Thorne, L., Barnicle, D. A., et al.: Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J. Gen. Virol.* 87, 471–477 (2006).
- 9) Gavier-Widén, D., Nöremark, M., Benestad, S., et al.: Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16, 562–567 (2004).
- 10) Grassi, J., Comoy, E., Simon, S., et al.: Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.* 149, 577–582 (2001).
- 11) Gretzschel, A., Buschmann, A., Langeveld, J., et al.: Immunological characterization of abnormal prion protein from atypical scrapie cases in sheep using a panel of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 87, 3715–3722 (2006).
- 12) Hayashi, H. K., Yokoyama, T., Takata, M., et al.: The N-terminal cleavage site of PrP^{Sc} from BSE differs from that of PrP^{Sc} from scrapie. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1024–1027 (2005).
- 13) Hunter, N., Genotyping and susceptibility of sheep to scrapie. In: Prion diseases. (Baker, H. F. & Ridley, R. M., eds.) 211–221, Humana press Inc. Totowa (1996).
- 14) Klingeborn, M., Wik, L., Simonsson, M., et al.: Characterization of proteinase K-resistant N- and C-terminally truncated PrP in Nor98 atypical scrapie. *J. Gen. Virol.* 87, 1751–1760 (2006).
- 15) Lühken, G., Buschmann, A., Brandt, H., et al.: Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet. Res.* 38, 65–80 (2007).
- 16) Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., et al.: Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine

- prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.* 86, 231–235 (2005).
- 17) Moynagh, J. & Schimmel, H.: Tests for BSE evaluated. *Nature* 400, 105 (1999).
- 18) Onnasch, H., Gunn, H. M., Bradshaw, B. J., et al.: Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet. Rec.* 155, 636–637 (2004).
- 19) Orge, L., Galo, A., Machado, C., et al.: Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J. Gen. Virol.* 85, 3487–3491 (2004).
- 20) Philipp, W. J., Kollmorgen, N., van Iwaarden, P., et al.: The evaluation of rapid post mortem tests for the diagnosis of TSE in sheep. European commission, 16 June 2004.
- 21) Prusiner, S. B.: Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515–1522 (1991).
- 22) Saunders, G. C., Cawthraw, S., Mountjoy, S. J., et al.: PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J. Gen. Virol.* 87, 3141–3149 (2006).
- 23) Shimada, K., Hayashi, H. K., Ookubo, Y., et al.: Rapid PrP^{Sc} detection in lymphoid tissue and application to scrapie surveillance of fallen stock in Japan: variable PrP^{Sc} accumulation in palatal tonsil in natural scrapie. *Microbiol. Immunol.* 49, 801–804 (2005).

Summary

Retrospective surveillance of atypical scrapie in Japan

Ayumu YOSHIDA ¹⁾, Kentaro MASUJIN ²⁾, Morikazu IMAMURA ²⁾, Yoshifumi IWAMARU ²⁾,
Shirou MOHRI ²⁾ & Takashi YOKOYAMA ^{2)*}

Recently, atypical scrapie cases have increased mainly in genetically scrapie-resistant sheep in Europe. The characteristics of the abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) and its deposition pattern in the brain differ between atypical and classical scrapie sheep. During a 4-year long active surveillance of Japanese sheep and goats for transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), 839 brains were collected; all samples were negative in western blot for the PrP^{Sc} of classical scrapie. In this study, we reexamined these samples by performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in an attempt to detect atypical scrapie. No positive results were obtained in these ELISA tests. PrP genotyping revealed that most Japanese sheep are susceptible to atypical scrapie. Therefore, diagnostic and/or surveillance tools for atypical scrapie are necessary.

Key words: atypical scrapie, prion, surveillance, PrP genotype