

(補) 抗 PrP 抗体および病理切片の前処理法について

現在、抗 PrP ペプチドウサギ抗体とマウスモノクローナル抗体が BSE 確認検査に利用可能である。前者には B103 (帶畜大) と T4 (感染研) があり、後者には 44B1 と 43C5 (ともに帶畜大) がある。抗体と切片の前処理法との組み合わせが結果に影響を与えることが判明した。現状では蒸留水中でのオートクレープ後に、抗体は B103 を主に、44B1 を従とするのが望ましい。

1. 切片の前処理法

脱パラ後の病理組織切片の前処理は PrP^C を壊し、PrP^{Sc} に対する反応性を高める（抗原性の回復ないし抗原露出）目的で行われ、BSE 検査には必須な処理である。以下の 2 種類の前処理方法が検討されてきた。

1) 蒸留水中で 121°C、20 分

2) 1mM 塩酸水溶液で 121°C、20 分

古くはプロイティナーゼ処理が追加して行われたが、現在の迅速固定包埋法では不要である。

上記 2 方法はいずれも 400 ml の蓋付きステンレス製バットに、切片をいれた染色カゴを入れて全く同じ条件下でオートクレープ処理した。

2. 抗体の性状

a) B103 ウサギ抗体 : PrP タンパク N 末の 103-121 ペプチドを抗原として作製。4.6 mg/ml

b) T4 ウサギ抗体 : PrP タンパク C 末の 221-239 ペプチドを抗原として作製。0.6 mg/ml

* 上記二つのウサギ抗体は affinity purified antibody である。

c) 44B1 マウスモノクローナル抗体 : 155-231 を認識。4 mg/ml

d) 43C5 マウスモノクローナル抗体 : 161-169 を認識。4.6 mg/ml

3. 抗体と前処理法

抗体および 希釈倍数	1) DDW 121°C, 20 分		2) 1mM HCl 121°C, 20 分	
	Pos	Neg	Pos	Neg
B103 x500	+/-	-/-	3+</+N	-/+D
T4 x1000	2+/-	-/-	3+>/-	-/+-
44B1 x500	+/-	-/-	2+</-	-/-
43C5 x2000	2+/+D	-/+	3+/2+D	-/3+D

Pos: 陽性対照（北海道 2 例目）、Neg: 隆性対照（以前非特異がみられたもの; B026）

+/-: シグナル陽性（程度） / 非特異反応（程度）

今回使用した抗体は富士レビオ製なので抗体濃度は 1 mg/ml。

4. コメント

- 1) B103 抗体は monospecific polyclonal 抗体であり、複数以上の抗原決定基を認識すると考えられる。1)の条件では通常、問題なく PrP^{Sc} を検出することができる。ただし反応性はやや弱い。ときに細胞の核に弱く非特異反応が認められる。2)条件下では、核に非特異染色が強く認められる。2)条件下での染色が最も良いが非特異反応があるので現状では 1)がよい。
- 2) T4 抗体は 2)条件下で最も良い結果が得られる。過去 3 例に非特異染色所見が観察された。この非特異陽性反応は B103、43C5 でも全く同じであったが、44B1 では非特異所見はみられなかった。なお T4 は配布する量が残っていない。
- 3) 44B1 はどの条件でも使用でき非特異反応が見られない特徴があるが、若干反応強度（シグナルの強さ）が弱い。抗体染色力値は 43C5 の方が 44B1 より高い。
- 4) 43C5 はいずれの方法においてもオリーブ核等の神経網にびまん性に着色する非特異反応が見られる。

食安監発第1014001号
平成16年10月14日

各 都道府県
保健所設置市 衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長

BSE対策に関する調査について

特定部位の取扱い状況については、平成15年2月25日付け食監発第0225001号等により調査を実施してきたところですが、今般、その後の状況を把握することとしたので、別紙様式1の調査票（個票）により、各と畜場について調査し、別紙様式2の調査票（自治体取りまとめ用）に必要事項を記載の上、11月12日（金）までに別紙様式2をFAXにて当課あて送付方よろしくお願いします。また、別紙様式1についても、後日、郵送により送付方お願いします。

調査票の記入に当たっては、と畜場管理者等の関係者に直接事実関係等を確認の上、記入されるようお願いします。

なお、調査結果については、報道機関等への公表、及びと畜場から排出される汚泥の肥料への利用に係るリスク評価を進めている農林水産省あて情報提供する場合があることを申し添えます。

(別紙様式1)

特定部位の取扱調査票(個票)

と畜場名

※記載上の注意事項: [] には○×、() には記載事項、[] には数値、
< >はどちらかに○を記入する。

1 調査対象施設

平成16年10月末日現在、牛のとさつを行っているか

(2~5の調査事項は、1で○をつけた施設が、6~7については、牛、めん羊及び山羊のとさつを行う施設が、平成16年10月末日時点として、回答すること。)

2 通常の牛のスタンニング方法

(1) スタンガン(とさつ銃)を使用しているか

○の場合	① 弹の先が頭蓋腔内に入るものが ② 弹の先が頭蓋腔内に入らないものが

○の場合 ① 弹の先が頭蓋腔内に入るものが

② 弹の先が頭蓋腔内に入らないものが

(2) と畜ハンマーを使用しているか

(3) 圧縮した空気又はガスを頭蓋腔内に注入する方法を用いているか

(4) その他()

3 牛のとさつ時のピッシングについて

ピッシングを行っているか

○をつけた施設についてのピッシングの頻度

- ① 全頭~ほぼ全頭について行っている
② 牛の状態、出荷者等により行ったり、行わなかったりする
③ ほとんど行わないが、稀に行っている④
④ 上記②又は③に該当する場合はピッシングを行う頭数の割合

① 全頭~ほぼ全頭について行っている
② 牛の状態、出荷者等により行ったり、行わなかったりする
③ ほとんど行わないが、稀に行っている④
④ 上記②又は③に該当する場合はピッシングを行う頭数の割合

[約 割]

4 牛の背割りによるせき臓片の飛散防止について

(1) 基本的事項

- ① 鋸の歯を洗浄しながら切断し、せき臓片を回収している
② 回収したせき臓片を焼却している
③ 背割鋸は一頭毎に十分に洗浄消毒している
④ 背割り後、せき柱中のせき臓を金属属性器具を用いて除去している
⑤ 除去後、高圧水により洗浄している
⑥ と畜検査員が枝肉へのせき臓片の付着が無いことを確認している

① 鋸の歯を洗浄しながら切断し、せき臓片を回収している
② 回収したせき臓片を焼却している
③ 背割鋸は一頭毎に十分に洗浄消毒している
④ 背割り後、せき柱中のせき臓を金属属性器具を用いて除去している
⑤ 除去後、高圧水により洗浄している
⑥ と畜検査員が枝肉へのせき臓片の付着が無いことを確認している

(2) (1) の基本的事項以外の飛散防止措置を講じている

- ① 背割りを正中線からずらしている
② 背割り前にせき臓吸引機等を用いた除去を行っている

○の場合、具体的なせき臓除去の実施方法 < 吸引式 · 押出し式 >

- ③ せき臓除去処理により除去されるせき臓の割合(除去率) [%]

※ 除去率は、任意の連続した5頭について次式により得られた一頭当たりの除去率の平均値を算出すること。

と体からのせき臓除去率

吸引法又は押出し法により除去されたせき臓の重量を秤で測定したものをA(g)とし、吸引法又は押出し法により除去しきれなかったせき臓を背割り後除去し、その重量を秤で測定しA値に加えたものをB(g)とする。

これらの値から、と体からのせき臓除去率($100 \times A / B (\%)$)を算出する。

5 牛の特定部位の焼却について

- (1) と畜場内の施設で焼却している
- (2) 産業廃棄物処理業者に委託し焼却している
- (3) 市町村等の産業廃棄物処理施設で焼却している
- (4) 専用の化製場で肉骨粉等にしてから焼却している

・専用の化製場の名称、所在地を記載：

〔名 称：

所在地：

〕

・焼却施設の名称、所在地を記載：

〔名 称：

所在地：

〕

・焼却の確認方法を具体的に記載：

〔

〕

- (5) 専用の化製場以外の化製場で肉骨粉等にしてから焼却している

--

・専用の化製場の名称、所在地を記載：

〔名 称：

所在地：

〕

・焼却施設の名称、所在地を記載：

〔名 称：

所在地：

〕

・焼却の確認方法を具体的に記載：

〔

〕

6 めん羊及び山羊のＳＲＭの取扱いについて

- (1) 平成14年4月1日から本年10月末日までに、12ヶ月齢以上のめん羊及び山羊をとさつしたか

(2) めん羊及び山羊のＳＲＭの焼却について

- ① と畜場内の施設で焼却している
- ② 産業廃棄物処理業者に委託し焼却している
- ③ 市町村等の産業廃棄物処理施設で焼却している
- ④ 専用の化製場で肉骨粉等にしてから焼却している

7 文書の作成等に関すること

(1) ＳＲＭに係るＳＳＯＰの作成について

平成9年1月28日付け衛乳第24号「と畜場法施行規則の一部を改正する省令の施行等について」通知及び平成9年1月28日付け衛乳第25号運用通知によりＳＲＭの処理については、「各と畜場の特質を考慮した標準的な作業手順、確認の方法等を規定したＨＡＣＣＰシステムの考え方方に沿った文書（ＳＳＯＰ）を作成し、この文書に基づき各事項が確実に実施されていることの確認を行うこと。」と規定しているが、その作成状況について。

S S O P は、< 作成済み ・ 作成されていない >

(別紙様式2)

特定部位の取扱調査票（自治体取りまとめ用）

自治体名

1 調査対象施設

平成16年10月末日現在、牛のとさつを行っていると畜場数

施設

2 通常の牛のスタンニング方法

(1) スタンガン（とさつ銃）を使用していると畜場数

施設

① 弾の先が頭蓋腔内に入るも

施設

② 弾の先が頭蓋腔内に入らない

施設

(2) と畜ハンマーを使用していると畜場数

施設

(3) 圧縮した空気又はガスを頭蓋腔内に注入する方法を用いていると畜場数

施設

(4) その他 ()

)

3 牛のとさつ時のピッシングについて

(1) ピッシングを行っていると畜場数

施設

ピッシングの頻度

① 全頭～ほぼ全頭について行っていると畜場

施設

② とさつする牛の状態、出荷者等により行ったり、行わなかったりする

施設

③ ほとんど行わないが、稀に行っていると畜場

施設

④ 上記②又は③に該当する施設のピッシング頭数割合の平均

[約 割]

(2) ピッシングを行っていないと畜場数

施設

4 牛の背割りによるせき髓片の飛散防止について

(1) 基本的事項

① 鋸の歯を洗浄しながら切断し、せき髓片を回収している

施設

② 回収したせき髓片を焼却している

施設

③ 背割鋸は一頭毎に十分に洗浄消毒している

施設

④ 背割り後、せき柱中のせき髓を金属性器具を用いて除去している

施設

⑤ 除去後、高圧水により洗浄している

施設

⑥ と畜検査員が枝肉へのせき髓片の付着が無いことを確認している

施設

(2) (1) の基本的事項以外の飛散防止措置を講じていると畜場数

施設

① 背割りを正中線からずらしている

施設

② 背割り前にせき髓吸引機等を用いた除去を行っている

施設

せき髓除去の実施方法 (吸引式 施設・押出し式 施設)

③ せき髓除去処理により除去されるせき髓の割合 (除去率)

[%]

※ 除去率は、各と畜場ごとの平均値を用い算出すること。

5 牛の特定部位の焼却について

- (1) と畜場内の施設で焼却している
- (2) 産業廃棄物処理業者に委託し焼却している
- (3) 市町村等の産業廃棄物処理施設で焼却している
- (4) 専用の化製場で肉骨粉等にしてから焼却している

・専用の化製場の名称、所在地を記載：

〔名 称：
所在地：〕

_____ 施設
_____ 施設
_____ 施設
_____ 施設

・焼却施設の名称、所在地を記載：

〔名 称：
所在地：〕

〕

・焼却の確認方法を具体的に記載：

〔
〕

〕

- (5) 専用の化製場以外の化製場で肉骨粉等にしてから焼却している

_____ 施設

・専用の化製場の名称、所在地を記載：

〔名 称：
所在地：〕

〕

・焼却施設の名称、所在地を記載：

〔名 称：
所在地：〕

〕

・焼却の確認方法を具体的に記載：

〔
〕

〕

6 めん羊及び山羊のＳＲＭの取扱いについて

- (1) 平成14年4月1日から本年10月末日までに、12ヶ月齢以上のめん羊及び山羊をとさつしたと畜場数

_____ 施設

(2) めん羊及び山羊のＳＲＭの焼却について

- | | |
|--------------------------|----|
| ① と畜場内の施設で焼却している | 施設 |
| ② 産業廃棄物処理業者に委託し焼却している | 施設 |
| ③ 市町村等の産業廃棄物処理施設で焼却している | 施設 |
| ④ 専用の化製場で肉骨粉等にしてから焼却している | 施設 |

7 文書の作成等に関すること

(1) ＳＲＭに係るＳＳＯＰの作成について

平成9年1月28日付け衛乳第24号「と畜場法施行規則の一部を改正する省令の施行等について」通知及び平成9年1月28日付け衛乳第25号運用通知によりＳＲＭの処理については、「各と畜場の特質を考慮した標準的な作業手順、確認の方法等を規定したＨＡＣＣＰシステムの考え方方に沿った文書（ＳＳＯＰ）を作成し、この文書に基づき各事項が確実に実施されていることの確認を行うこと。」と規定しているが、その作成状況について。

- | | |
|-----------------|----|
| ① ＳＳΟＰは作成済みである | 施設 |
| ② ＳＳΟＰが作成されていない | 施設 |

科学技術振興調整費

我が国における牛海綿状脳症(BSE)診断法
の標準化に関する緊急調査研究

(平成13年度)

成 果 報 告 書

平成14年6月

文部科学省研究振興局

II 研究成果の概要

1. 総 括

1. 1. 牛海綿状脳症(BSE)脳材料の分析前処理条件の検討 (播谷 亮)

2001年9月に我が国で牛海綿状脳症（BSE）発生が確認され、家畜衛生上ののみならず公衆衛生上の問題も指摘され、大きな社会的問題となっている。こうした中で、BSEを的確に診断するため診断法の標準化が急務となっている。BSEの診断は脳を用いた病理組織学的、免疫組織化学的および生化学的検査により行われているが、脳材料の的確な採材部位や病理組織の固定条件に関する検討はこれまで充分には実施されてこなかった。今回、BSEの診断に適した採材部位を明らかにし、また脳の固定条件の診断への影響を評価することを目的として研究を実施し、以下の成果を得た。1) BSEの病理組織学的診断に適した採材部位を明らかにするために、健康牛の延髄門領域における神経核の分布を検査したところ、BSEの病理組織学的診断のために顕微鏡検査することが必要とされている三叉神経脊髄路核、孤束核および迷走神経背側核全てを確実に観察するためには、門から頭側約8.5mmまでの部分を採材する必要があることが示された。2) 脳の固定前の保存の病理組織学的検査に及ぼす影響について検査したところ、96時間冷蔵保存した組織では、一部の灰白質で海綿状変性と類似した小空胞形成が散見された。3) BSE感染牛の延髄の各領域におけるPrP^{Sc}の蓄積量について検討したところ、延髄前部（橋側）の方が、後部（脊髄側）より多量のPrP^{Sc}が蓄積することが明らかとなった。

1. 2. 牛海綿状脳症（BSE）の生化学的確定診断法の標準化（横山 隆）

BSEの生化学的確定診断法についてスクリーニング検査、確定検査の両面からの検討を行った。市販のBSE診断キットの有用性、操作性について検討し、各キットについて良好な成績を得た。さらに、BSE試料の保存条件や調整後の試料の保存に伴う検出結果への影響を検討した。BSE確定診断に用いるWBを簡便・迅速かつ検出感度の高い方法に改良し標準化した。認識するエピトープが異なる3種類の抗体（モノクローナル抗体44B1,T2、ポリクローナル抗体B103）を確定診断用の抗体として選別、さらに確定診断のための生化学的検査プロトコールを策定し、検査体制を整備した。スクリーニング検査のELISAに比べて、検出感度が高いWBを確定検査として整備することができた。これらの成果は、現在我が国で実施されているBSEサーベイランス検査にて活用されている。

1. 3. 牛海綿状脳症（BSE）の免疫病理学的確定診断法の標準化（久保正法）

農林水産省BSEサーベイランス事業並びにBSEとの類症鑑別を目的に全国から搬入された国内飼養牛の延髄について、病理組織学的検討を行うとともに、その検討期間中の2001年9月に千葉県で発生したBSEの確定診断を行った。さらに、組換えマウスPrPに対するマウスマonoクローナル抗体がBSEの免疫組織化学的診断に使えるか否かを検討した。その結果、1種類のmonoクローナル抗体は、これまで診断に用いてきたウサギのポリクローナル抗体と同様な反応性を示すことが判明し、免疫組織化学的診断への有用性が示された。

1. 4. 牛海綿状脳症（BSE）のと畜場におけるスクリーニング法開発に係る緊急研究 (佐多徹太郎)

BSEの畜場におけるスクリーニング法開発に係る緊急研究として、平成13年11月から研究を開始した。平成13年10月から全国で始まった牛海綿状脳症検査では、スクリーニング検査としてELISAが、確認検査としてWBおよび病理・免疫組織化学検査が用いられている。これらの検査法は試料中のPrP^cをあらかじめ蛋白分解酵素等で消化分解した後に、これらに抵抗性で残存するPrP^{Sc}を酵素抗体法で検出することを基本原理としている。スクリーニング検査で採用されているバイオラッドの検査キットでは、本来陰性である検体が陽性と判定されるいわゆる疑陽性例が、現在まで0.01%程度の頻度で認められている。その原因として、①抗体の非特異反応、②プロテイナーゼKによるPrP^cの消化が不十分であることなどが考えられる。検査の信頼性や正確性を期するためには原因となる物質を予め除去しておくことが望ましい。異常型プリオントンパクの簡便な特異的濃縮方法について検討した。その結果、リンタングステン酸を用いた沈澱法により異常型プリオントンパク質を簡便に濃縮することが判明した。スクリーニングにおける牛延髄組織をこの方法で前処理することにより、正確で信頼性のある結果をもたらすことができよう。一方、確認検査として病理免疫組織化学法について迅速検査法を開発することを目的として、種々の検討を行った。BSEプリオントンはBSL-2病原体でありホルマリン固定後でも感染性は維持され、ギ酸処理でも完全に不活化されないので、バイオセーフティ処置が必要である。病理組織形態の保持とともにプリオントンを延髄組織内で高い感度で検出するための条件を検討し、我が国のBSE陽性ないし陰性牛延髄検体で確認した。その結果、2日以内で結果ができるプロトコールを完成した。

2. 研究項目別成果の概要

2. 1. 牛海綿状脳症(BSE)脳材料の分析前処理条件の検討

2. 1. 1. 牛の延髄における神経核の分布に関する研究

BSEの診断に適した採材部位を明らかにするために、健康牛5頭の延髄について門を中心前に前後約1.7cmの範囲で神経核の分布を組織学的に精査した。その結果、延髄門領域における神経核の分布が明らかになった。とくに、BSEの病理組織学的診断のために顕微鏡検査することが必要とされている三叉神経脊髄路核、孤束核および迷走神経背側核全てを確実に観察するためには、門から頭側約8.5mmまでの部分を採材する必要があることが示された。

2. 1. 2. 脳の固定前の保存の病理組織学的検査に及ぼす影響

保存条件の病理組織学的診断への影響を調べるために、頭蓋から摘出した正常牛の脳を、0, 1.5, 6, 24および96時間冷蔵および室温保存後に10%中性緩衝ホルマリンおよび10%ホルマリン生理食塩水で固定し、病理組織学的検査を実施した。その結果、96時間冷蔵保存した組織では、灰白質が水腫様に硝子化し、一部で小空胞が散見された。一方、室温保存では24時間後に固定した組織で、一部の灰白質が水腫様に硝子化していた。96時間室温保存後に固定した組織は自己融解が著しく、組織学的検査には使用不可能であった。固定液の違いによる組織形態の差異は観察されなかった。

2. 1. 3. BSE感染牛の延髄の各領域におけるPrP^{Sc}の蓄積量の検討

英国より輸入したBSE試料を用いて、WBによる半定量的なPrP^{Sc}の解析を行った。PrP^{Sc}の

蓄積は均一ではなく、脳の各領域、採材する小片により偏りがあることが明らかとなった。輸入試料は門部が英国での病理学的診断のために使用され、検査不可能であったが、その前後を比較すると、前部（橋側）の方が、後部（脊髄側）より多量の PrP^{Sc} が蓄積することが明らかとなつた。

2. 2. 牛海綿状脳症（BSE）の生化学的診断法の標準化

BSE の診断には、従来の病理学的検査法に加えて、ELISA、WB などの生化学的診断法が用いられている。簡便・迅速かつ高い検出感度の BSE 診断体制を確立するには、スクリーニング検査ならびに確定検査法に至る一連の診断方法について、個々の条件検討、改良ならびに手法の標準化が必要となる。そこで、1) 牛海綿状脳症（BSE）各種生化学的診断法の比較とその標準化及び 2) 牛海綿状脳症（BSE）生化学的診断法の改良に関する以下の 2 つの研究を行い、生化学的診断法の標準化を行つた。

2. 2. 1. 牛海綿状脳症（BSE）各種生化学的診断法の比較とその標準化

動物衛生研究所で作出された、またはヨーロッパで標準的に使用されている抗 PrP 抗体と BSE 由来 PrP^{Sc}との反応性を WB で検討した。羊 PrP^{Sc}と反応するモノクローナル抗体の一部は、BSE 由来 PrP^{Sc}とも反応し、確定検査に応用可能であることが示された。また、市販の BSE 診断キットの有用性、操作性について検討し、各キットについて良好な成績を得た。さらに、バイオラッド ELISA キットを用いて、BSE 試料の保存条件や調整後の試料の保存に伴う、検出結果への影響を検討した。同キットを用いて、腐敗した試料中からの PrP^{Sc} の検出も可能であり、病性鑑定で想定される死後の材料についての検査も可能であると推察された。

2. 2. 2. 牛海綿状脳症（BSE）生化学的診断法の改良

BSE 確定診断に用いる WB を簡便・迅速かつ検出感度の高い方法に改良し、標準化した。認識するエピトープが異なる 3 種類の抗体（モノクローナル抗体 44B1, T2、ポリクローナル抗体 B103）を確定診断用の抗体として選別し、検査体制を整備することができた。また、確定検査法で用いられている WB はスクリーニング検査で用いられている ELISA に比べて 4 倍以上、検出感度が高いことを明らかとした。本課題の成果は、現在我が国で実施されている BSE 検査において実際に活用されている。

2. 3. 牛海綿状脳症（BSE）の免疫病理学的確定診断法の標準化

2001 年 9 月に千葉県で発生した BSE の確定診断を行つた。組換えマウス PrP に対するマウスモノクローナル抗体が BSE の免疫組織化学的診断に使えるか否かを検討した。1 つのモノクローナル抗体は、これまで診断に用いてきたウサギのポリクローナル抗体と同様な反応性を示したので、この抗体は免疫組織化学的診断に使えるものと判断した。

2. 4. 牛海綿状脳症（BSE）のと畜場におけるスクリーニング法開発に係る緊急研究

スクリーニング検査で疑陽性となるのを防ぐために、非特異反応の原因となる物質をあらかじめ除去しておくことがのぞましい。異常型プリオントンパク質の簡便な濃縮法として、磁気

ビーズ結合抗プリオン抗体、プラスミノーゲン結合磁気ビーズ及び、特異的沈殿法としてリンタングステン酸を用いる方法を比較した。その結果、リンタングステン酸を用いる沈殿法が PrP^{Sc} の簡便な濃縮に有効であることが判った。

国立感染症研究所では BSE プリオンをバイオセーフティレベル 2 (BSL-2) 病原体と規定した BSE プリオンを含むと予想される牛延髄組織を用い、食品検査として許される時間内に結果を出すことが可能となる迅速かつ信頼性のある病理・免疫組織化学法を開発することを目的に、バイオセーフティ、固定法、包埋法、切片の前処理法、抗プリオン抗体、免疫組織化学的検出法を検討した。そして実際の確認検査を行うことでその方法を検証した。その結果、検体受け取りから病理・免疫組織化学の結果を得るまで 2 日以内で行えるプロトコールを完成した。

3. 研究の波及効果及び問題点

3. 1. 牛海绵状脳症(BSE)脳材料の分析前処理条件の検討

BSE の確定検査は、病理組織学的、免疫組織化学的および生化学的検査により実施され、いずれにおいても延髄門部を中心に脳幹部の適正な採材が行われることを前提している。病理組織検査では 3 種類の神経核を含む横断面に BSE の特徴病変が高頻度に出現するとされているが、実際にはこれら神経核の分布には年齢や個体差もあって、採材部位の標準化にはそれらの立体分布を調べる必要がある。さらに、同じく確定検査とされている免疫組織化学的検査と生化学的検査による PrP^{Sc} の検出においても、蓄積部位の異同を精査し特徴病変部位との位置関係も明確にする必要がある。このため本研究の成果は、BSE のスクリーニング検査と確定検査のための脳材料の採材方法とその後の処理における指針となるものである。なお、今回検討した BSE 材料の個体数に制約があることから、今後も国内外の関係研究機関等との連携により検討を重ねる必要がある。

3. 2. 牛海绵状脳症 (BSE) の生化学的確定診断法の標準化

本研究課題「BSE の生化学的診断法の標準化」で得られた成果は、食肉衛生検査所（と畜場）での健康家畜の BSE スクリーニング検査、家畜保健衛生所での病畜の BSE スクリーニング検査ならびに、それに続く BSE 確定検査において、実際に活用されている。また、将来的には各県での確定検査体制の整備も検討されており、その際には本研究成果が参考になると考えられる。これらの点から本研究成果の波及効果、普及状況は高いと考えられる。現在のところ、検査体制に大きな問題は生じていないが、万一問題が生じた場合には、その都度、各班員が協力して問題解決にあたることとなっている。

将来の BSE の診断に関する研究面については以下の問題が考えられる。実際に BSE の生化学的確定診断法を標準化するためには、BSE 感染牛の生材料が必要となる。現状では、英国から輸入した 10 頭の BSE 感染牛と国内で発生した BSE 牛 4 頭の試料が存在するのみである。さらに、これらの試料は脳の門部を中心とした小片であり、研究を遂行するに十分な材料とは言い難い。本研究課題でも、その点は大きな障害となった。BSE 研究施設の建設が計画されているが、数百頭規模の牛を用いた感染実験は現時点では望めないことから、限られた試料を有効利用した共同研究体制の確立が必要と考えられる。

3. 3. 牛海綿状脳症（BSE）の免疫病理学的確定診断法の標準化

現行農林水産省BSEサーベイランス体系では、免疫組織化学的検査は当面動物衛生研究所が担当することになっている。しかしながら、将来的には当該検査を動物衛生研究所以外の機関が担当することが予想され、その際には免疫組織化学的検査に用いる一次抗体には、ロット差や量的制約のあるポリクローナル抗体に代えて、性状が均一で大量供給が可能なモノクローナル抗体を用いることが望ましい。そこで本研究ではモノクローナル抗体の作出を試み、免疫組織化学的検査における反応性を検討した。得られた成果は、今後の免疫組織学的検査に有効活用される予定である。また、2000年9月のBSE国内初発例は、当時実施されていた農林水産省BSEサーベイランス事業のなかで、県が実施した病理組織学的検査において確認検査の必要のある症例として摘発された。このように、病理組織検査は依然BSEの診断においては重要な位置づけになっているが、国内飼養牛に延髄における海綿状病変を示すものの、確定検査の結果でBSE陰性となった症例が認められている。今後も病理組織学的検査と確定検査の関係を明確にしつつ、BSE診断精度の向上を目指すこととする。

3. 4. 牛海綿状脳症（BSE）のと畜場におけるスクリーニング法開発に係る緊急研究

リンタングステン酸による沈澱法により、スクリーニングにおける疑陽性率を下げること及び濃縮効果により検査の高感度化が図れる可能性が示された。

食品検査として迅速かつ信頼性のある病理・免疫組織化学検査法を確立することができた。全国の食肉衛生検査所や都道府県の衛生研究所で実際にどうかについてはこれから検討することになるが、実施可能性は高いと考えられる。現在では44B1モノクローナル抗体を用いた検出がもっとも良いと考えられるが、よりよい抗体の開発にむけた検討材料を不十分ながらも揃えることができ、将来の検討に有用である。しかしながらBSE確認検査の作業を1日の労働時間内に完了するためにはさらなる検討が必要である。

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（牛海綿状脳症研究分野）

プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の
感染・発症機構に関する研究班

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所感染病理部)

平成14年度厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（牛海綿状脳症研究分野）

総括研究報告書

1. プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究

主任研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究要旨 本研究班では、(1)プリオンの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品等のプリオン汚染評価方法の検討やプリオン不活化法および検証方法の開発等、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行うことを目的とした。わが国にはプリオン研究者は少ないので共同研究が必要となり、またウシ遺伝子改変マウスやBSE ウシ検体そして靈長類を用いた感染実験材料は研究班内の共通研究資源とし、それぞれの実験研究に役立てることで研究を加速していく。また研究期間中に得られた結果をもとに班員相互の協力体制をとり効率よく研究が進むようにすることも考えている。本年度は短期間であったが予想以上の結果が得られたので、来年度の成果が期待できる。

分担研究者（10名）

古岡 秀文 帯広畜産大学畜産学部獣医学科病態獣医学講座・助教授
堀内 基広 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教授
石黒 直隆 帯広畜産大学畜産学部獣医学科獣医公衆衛生学教室・助教授
松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究所免疫生物学研究室・教授
山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部・室長
三好 一郎 東北大学大学院医学研究科付属動物実験施設・助手
松田純一郎 国立感染症研究所獣医学部・室長
森 清一 北海道畜産試験場畜産工学部・部長
寺尾 恵治 国立感染症研究所筑波医学実験用靈長類センター・センター長
沢谷 広志 神奈川県食肉衛生検査所・所長

A. 研究目的

平成13年9月に日本ではじめて牛海綿状脳症(BSE)例が発見され、食肉の安全性を図るために食肉衛生検査所で全頭検査が始まると新しい例も見つかった。BSE が原因と考えられるヒトの変異型クロイツフェルドヤコブ病

(vCJD)はわが国では発見されていないが、英国等世界で138例見つかっており、食品分野のみならずBSE 等のプリオン感染症対策は緊急的重要な課題である。

本研究では、(1)プリオンの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品等のプリオン汚染評価方法の検討やプリオン不活化法および検証方法の開発等、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行う。そのためには、正常型および異常型プリオン蛋白質の相違とプリオンの動物体内増殖機構、プリオン病に対する感受性、そして発症機構を明らかにするため、基礎および応用面から共同して総合的に研究を行う。これらを通して、プリオンの免疫化学的、病理学的およびバイオアッセイによる検査法、プリオン不活化法等、食品分野における牛海綿状脳症対策に役立つ具体的方法を開発し、わが国の食品の安全性を向上させ、変異型クロイツフェルドヤコブ病の発生対策に資することを目的とする。

B. 研究方法

3年間の全体計画は下記の通り3本の柱を立て実施する。研究期間中に得られた結果をもとに班員相互の協力体制をとり効率よく研究が進むようにする。BSE プリオントンはバイオセーフティレベル2の病原体であり、実験としてその増殖を動物で行うことが多く、その場合はレベル3になる。各研究者の所属する施設でプリオントンを取り扱うレベル3相当の実験室は整備されていない場合もあるので、共同研究が必要となるからである。またウシ遺伝子改変マウスやBSE ウシ検体、そして霊長類を用いた感染実験材料は研究班内の共通研究資源とし、それぞれの実験研究に役立てることで研究を加速する。既知のごとく、プリオントンの感染性や伝達性の最終評価はマウス等の実験動物を必要とする。種のバリアーがあるため実験動物の発症には通常1年以上の潜伏期間を要する。したがって本研究の最終評価には研究期間の3年を越える可能性も考えられるが、結果を着実に積み上げていきたい。

本年度は3年計画の初年度であるが、実質的に10月からスタートしたので、それぞれの研究・開発の準備期間と位置づけられる一方、これまでプリオントン病研究に取り組んで来られた研究者にはBSE の視点をはずさないような研究をお願いした。

以下は本研究班の3つの柱と課題および担当者である。

1) プリオントンの高感度・迅速検査法の開発には、プリオントン蛋白質の構造変化の解析(堀内)、プリオントン特異抗体の開発と検討(松田(治))、検出方法の検討(佐多)、プリオントン蛋白質の拮抗的検出・定量法の開発(山河)を行い、また検討材料としてのプリオントンは感染牛由来および遺伝子改変マウスで作製しプリオントン株として供給する(松田(潤)、三好)。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明については3年を越える時間を要することが予想されるが、従来のプリオントン検査法とともに、遺伝子改変マウス(三好)によるバイオアッセ

イ系の開発(松田(潤))、マウスやサル等の実験動物モデルの作製(寺尾)と解析(古岡、佐多)、感染牛での検討(森、古岡)、プリオントン感受性解析を目的としたPrP遺伝子型の検討(石黒)、そしてプリオントン病病態解析を目的としたプロテオーム解析によりマーカー蛋白質の検索・同定(山河)により行う。

3) 食品の安全性を図るために食肉の処理方法の検討や前述した検査や病態解析結果を食品分野で検証し応用するに食肉衛生検査所における実際的な検討が不可欠であり、全国食肉衛生検査所協議会の会員に協力を求め、これらを総合的に用いて有効な食肉汚染防止法を開発する(沢谷)。

(倫理面への配慮)

動物実験は各施設の動物実験委員会の承認をえて、動物実験指針にもとづいて行う。「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、実験動物の使用を最小限にするとともに、取り扱いや処理には動物愛護の精神を持って臨む。またプリオントンの取り扱いは、国立感染症研究所におけるバイオセーフティー安全管理規定を遵守し、国際的な基準にも十分に配慮する。

C. 研究結果

1) プリオントンの高感度・迅速検査法の開発

PrP分子の構造および性状解析を目的としてエピトープの異なる10種類のモノクローナル抗体を使い、スクレイピーマウス脳精製PrP^{SC}やN2Aマウス神経芽腫細胞を用いて解析した。Proteinase K処理後のPrP^{SC}とは反応しなかったがグアニジン変性では反応がみられたので、これらのエピトープはPrP^{SC}凝集体分子上に抗体が結合できる形では存在していないことが判明した。また細胞膜上の成熟型に反応する抗体がある一方で細胞内の未熟型のみと反応するものがあった(堀内)。プリオントン検出に実用的レベルで利用可能なニワトリの抗プリオントンモノクローナル抗体のパネル化を進めかつ組

換え型ニワトリモノクローナル抗体の精製が可能となった（松田治）。ウシプリオントンの高感度バイオアッセイ系として、あるいはプリオントン病発症機構の解明に使えるウシプリオントン遺伝子改変マウスの作製を開始し、ファウンダー3匹を作出し、うち1系統で脳でのプリオントン遺伝子のmRNAを確認した（松田潤）。BSE確認検査のうち病理・免疫組織化学法を確立しマニュアル化した（佐多、古岡）。またウエスタンプロット法についても同様に確立した（堀内、山河）。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明

BSE全頭検査による摘発ウシの延髄組織について神経核とPrP^{SC}の分布を検討し、BSEの初期では迷走神経背側核が強く侵されついで知覚核や中縦路核に広がり、運動核は軽度であることが明らかとなった（古岡）。BSE陽性ウシの全身組織採材が可能であった2例についてPrP^{SC}の分布を病理免疫組織化学的に検討し、神奈川例では大脳基底核、皮質、小脳、脊髄、回腸末端部、神経節に、和歌山例では大脳、小脳、脊髄にプリオントンが検出された（佐多）。同様にウエスタンプロット法で神奈川例について検討したところ、大脳、小脳、脊髄、回腸遠位部、神経節みられ、これらの相対的沈着量を明らかにした。また延髄組織では検査に使用した門部分に強くみられ、ほかの部位ではほとんど認められなかった（山河）。ヒツジや山羊そしてウシのPrP遺伝子多型について検討したところ、ヒツジでは171番アルギニンをもつ個体が41/117頭、ヤギでは7カ所に変異が観察された。ウシでは6回のオクタリピートが大部分であったが5頭に5回のリピート例があり、また288塩基欠失例もみつかった（石黒）。ウシあるいはヒツジ/マウスキメラ型PrP^C遺伝子を導入した遺伝子改変マウスをウシ型3系統、ヒツジ型4系統を構築し、スクレイピープリオントン陽性1%脳乳剤を接種したところ、わずかな感受性増加がみられる場合もあったが、期待に反し潜伏期間は延長し発症率も低下した（三好）。カニクイサルを用いたBSEプリオントン感染モデルの作製により変異型CJDの病態解明お

よび早期診断法を開発すること、および経時に採取した血液、髄液、および主要組織を研究班の研究資源化にすることを目的として実験設備整備と実験準備を行った。とくに行動や神経機能解析のために迷路装置を用いて学習能力を評価し80%以上の正答率をえた（寺尾）。BSE疑似患畜18頭について定期的に臨床症状、血液、髄液、尿を採取し検討をおこなった。飼育中に3頭が別の原因で死亡したがプリオントンは認めなかった。また現在まで異常な症状や検査所見を示した例はなかった（森）。

3) 食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発

と畜時の脳・脊髄組織による食肉等への汚染防止法の開発を目的とし、と畜時のスタニングとピッシング操作と血液への神経組織汚染の関連について全国9カ所の食肉衛生検査所で検討した。ピッシングやスタニングによる血液への神経組織の混入について統計学的な有意差が得られなかつたが、心残血に高い傾向が認められた。血液や食肉中へのスパイク試験では十分な測定結果が得られた。またと畜方法による問題点が指摘できた（沢谷）。

D. 考 察

抗プリオントン抗体のパネルを用いた検討では、今後プリオントン感染性消失とプリオントンの構造変化を詳細に解析することが可能となると考えられ、また細胞に発現するプリオントンの染色パターンが異なることから生合成過程においてプリオントン構造が変化しうることおよび細胞小器官特徴的な分子種の存在が示唆された。このパネルは、ニワトリのモノクローナル抗体とともに、プリオントン構造の解析にも有用であるのみならず、検査法への応用も可能となると考えられる。

BSE確認検査の病理免疫組織化学検査法やウエスタンプロット法の改良が行われ、その実際的な意義もBSE陽性例の解析で明らかとなった。とくに、現在の延髄門部の迷走神経背側核を中心とする検査の根拠を与えるとともに、いろいろなバリエーションもあり得ることを示している。また特定部位の除去に根拠を与え

る結果が得られたことも重要である。これまでBSE ウシの検討は臨床症状を示したもので行われてきており、臨床症状の明らかでない初期の BSE 陽性ウシについて検討することは世界的にも例がなく、貴重なデータが得られていくと考えられる。今後は副交感神経系を中心とするより詳細な解析を積極的に進め、同時に種々の研究開発の研究資源としていきたい。

高感度バイオアッセイ系の開発およびこれらを用いた発症機構の解析には遺伝子改変マウスの作製が待ち望まれている。世界的にもごくわずかしか存在しないので、開発が進んでいることは成果と見なせる。また先に作製した遺伝子改変マウスの実験結果からも有用なマウスの開発が望まれる。疑似患畜での検討は困難が予想されるがウシ飼育に関し動物愛護上の問題をほぼクリアした限られた施設であるので今後に期待したい。またサルへの感染実験の準備が整ったので国内 BSE 陽性ウシ検体を用いた実験開始が行えるようになった。

と畜時における大脳や脊髄神経組織の汚染防止法の開発は一方で重要な問題である。今回の多施設での検討方法の確立とその結果や問題点の把握により新しい安全なと畜法の開発につながっていくものと期待される。

E. 結論

研究開始からの期間が短いにもかかわらず予想以上の結果が得られ、進捗状況は良好であると考えられた。今後は班員間の協力体制を明らかにし研究促進につなげていく。

F. 健康危険情報

とくにない。

G. 研究発表

1. 論文発表

省略（各分担研究報告書参照）。

2. 学会発表

省略（各分担研究報告書参照）。

厚生労働科学研究費補助金
食品安全確保研究事業

プリオൺ検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の
感染・発症機構に関する研究班

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者
佐多 徹太郎

(国立感染症研究所感染病理部)

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

1. 総括研究報告書 「プリオントウシ検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究」

主任研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究要旨 本研究班では、(1)プリオントウシの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行うことを目的とした。スクリーニング法の開発も進み、確認検査法の改良が行われた。わが国のBSE例における伝達性解析が進み、来年度にはおよその成果が得られよう。本年度にウシプリオントウシ遺伝子改変マウスの一部でプリオントウシの伝達が証明されたことは特筆に値する。一方で発症機構の検討を目的とした動物実験が開始され、来年度以降、成果が期待される。培養細胞を用いた実験系の開発が進行中である。また研究資源も順調に蓄積され、研究班内で分与や共同研究が促進された。と畜法の改良につながるデータも得られている。本年度までの進捗状況は良好と考えられ、来年度には大きな成果が得られる期待している。

分担研究者（17名）

古岡 秀文	帯広畜産大学畜产学部獣医学科 畜病理学教室・助教授
堀内 基広	北海道大学大学院獣医学研究科プリオントウシ病学教室・教授
品川 森一	動物衛生研究所プリオントウシ病研究センター・センター長
石黒 直隆	帯広畜産大学畜产学部獣医学科獣医公衆衛生学教室・教授
松田 治男	広島大学大学院生物圈科学研究所 免疫生物学研究室・教授
千葉 丈	東京理科大学基礎工学部生物工学科・教授
田村 守	北海道大学電子科学研究所・教授
堂浦 克美	東北大学大学院医学系研究科創生応用医学センター・教授
菊池 裕	国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部第3室・主任研究官
山河 芳夫	国立感染症研究所細胞化学部・室長
三好 一郎	名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物研究教育センター・助教授

松田潤一郎	国立感染症研究所獣医学部・室長
小野寺 節	東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
高橋 秀宗	国立感染症研究所感染病理部第三室・室長
森 清一	北海道畜産試験場畜産工学部・部長
寺尾 恵治	国立感染症研究所筑波医学実験用靈長類センター・センター長
佐々木裕之	埼玉県食肉衛生検査センター・所長

A. 研究目的

平成13年9月に日本ではじめて牛海綿状脳症(BSE)例が発見され、食肉の安全性を図るために食肉衛生検査所で全頭検査が始まり、平成16年3月までに計9頭が摘発され、端緒となつた例と最近の死亡牛検査で1例が農水省の家畜保健衛生所で発見され、わが国では現在11頭のBSEが見つかったことになる。昨年カナダと米国でもBSE例が摘発された。BSEが原因と考えられるヒトの変異型クロイツフェルドヤコブ病(vCJD)はわが国では発見されて

いない。英國等世界では 156 例見つかっており、食品分野のみならず BSE 等のプリオントリオ感染症対策は緊急的重要課題であることはいうまでもない。

本研究では、(1)プリオントリオの高感度・迅速検査法の開発、(2)牛海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の検討、および(3)と畜時の食肉汚染防止法の検討を行うことにより、食品等のプリオントリオ汚染評価方法の検討やプリオントリオ不活性化法および検証方法の開発等、食品分野における牛、および羊・山羊の海綿状脳症対策に役立つ研究を行う。そのためには、正常型および異常型プリオントリオ蛋白質の相違とプリオントリオの動物体内増殖機構、プリオントリオ病に対する感受性、そして発症機構を明らかにするため、基礎および応用面から共同して総合的に研究を行う。これらを通して、プリオントリオの免疫化学的、病理学的およびバイオアッセイによる検査法、プリオントリオ不活性化法、と畜法の改良等、食品分野における牛海綿状脳症対策に役立つ具体的方法を開発し、わが国の食品の安全性を向上させ、変異型クロイツフェルトヤコブ病の発生対策に資することを目的とする。

B. 研究方法

BSE プリオントリオはバイオセーフティレベル 2 の病原体であり、BSE プリオントリオをウシプリオントリオ遺伝子改変マウスで増殖させる実験の場合はレベル 3 としている。農水省の大型実験動物感染実験では、ウシへの BSE プリオントリオ脳内接種はレベル 2 で、体内感染であるため 1 ヶ月後にはレベル 1 となり、発症後の剖検はレベル 3 となるという。各分担研究者の所属する施設でプリオントリオを取り扱えるレベルの実験室は整備されていない場合もあるので、共同研究が必要となる。また、プリオントリオの感染性や伝達性の最終評価はマウス等の実験動物を必要とする。ウシ遺伝子改変マウスや BSE ウシ検体、BSE 実験感染ウシ検体、そして靈長類を用いた感染実験材料は研究班内の共通研究資源とし、分担研究者の実験研究に役立てることで研究を加速する。既知のごとく、種のバリアーがあるため

実験動物の発症には通常 1 年以上の潜伏期間を要する。昨年度および本年度で、牛プリオントリオ遺伝子改変マウスの作製にめどがつき、サルやウシでの感染実験をスタートしているが、いまだ途上であり、最終評価には 3 年を越える可能性も考えられる。本年度は、旧品川班が昨年度に終了したため、旧班員から本研究班に 7 名の研究者を分担研究者として追加した。各分担研究者の研究方法の詳細は各報告書を参照してほしい。

以下は本研究班の 3 つの柱と課題および担当者である。

1) プリオントリオの高感度・迅速検査法の開発には、プリオントリオ蛋白質の構造変化の解析(堀内)、プリオントリオ特異抗体の開発と検討(松田(治)、千葉、堀内)、病理組織での検出方法の検討(佐多、堂浦、古岡)、プリオントリオ蛋白質のウエスタンプロット法の検討(山河、堀内)、蛍光相關分光法を利用した新しい検査法の開発(田村)、標準陽性サンプルの開発(菊池)、また検討材料としてのプリオントリオは感染牛由来および遺伝子改変マウスで作製しプリオントリオ株として供給する(佐多、山河、松田(潤))。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明については、従来のプリオントリオ検査法の改良とともに、近交系マウスを用いた解析(品川)、遺伝子改変マウスによるバイオアッセイ系の開発(松田(潤))、マウス、ウシ、サル等の実験動物モデルの作製(高橋、森、寺尾)と解析(山河、古岡、佐多)、プリオントリオ感受性解析を目的とした PrP 遺伝子型の検討(石黒)、プリオントリオ接種マウスでのマイクロアレイ法による遺伝子解析(三好)、そしてプリオントリオ病病態解析を目的とした培養細胞系の開発(小野寺)により行う。

3) 食品の安全性を図るために食肉の処理方法の検討や前述した検査や病態解析結果を食品分野で検証し応用するに食肉衛生検査所における実際的な検討が不可欠であり、全国食肉衛生検査所協議会の会員に協力を求め、これを総合的に検討し、有効な食肉汚染防止法を開発する(佐々木)。

（倫理面への配慮）

動物実験は各施設の動物実験委員会の承認をえて、動物実験指針にもとづいて行う。「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、日本靈長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、実験動物の使用を最小限にするとともに、取り扱いや処理には動物愛護の精神を持って臨む。またプリオントの取り扱いは、国立感染症研究所におけるバイオセイフティー安全管理規定を遵守し、国際的な基準にも十分に配慮する。

C. 研究結果

1) プリオントの高感度・迅速検査法の開発

BSE 確認検査のうち病理・免疫組織化学法を 1 日で終了する迅速検査法を開発した（佐多）。免疫組織化学法では抗原賦活化法がキーポイントであり、今回新しいかつ高感度化法を開発した（堂浦、古岡）。またウエスタンプロット法についても高感度化し、非定型 BSE 例が診断できた（山河）。PrP 分子の構造および性状解析を目的に、プロテナーゼ抵抗性コアフラグメントの N 末端構造についてモノクローナル抗体で検討し、6 例の BSE は同じで 103AA 近傍まで消化されていることが示唆された。またヒツジスクレイピーでは分子量が異なり、構造の多様性鑑別が可能であることと日本のスクレイピーには複数の株が存在する可能性を示した（堀内）。ニワトリの抗プリオントモノクローナル抗体が BSE プリオントと特異的に反応すること、ファージで作製した抗体を二価化すると著しく高い反応性を有することを確認した（松田治）。高親和性抗プリオントンパク質抗体を作製するため DNA 免疫法を開発し、ポリクローナル抗体を開発した（千葉）。蛍光相関分光法で多量検体を微量で測定することができる小型で安価な測定装置を開発し、全自動化システムを構築している（田村）。BSE 検査の標準品確保を目的とし、ヒトグリオブロストーマ細胞株 TG98G が產生するプリオントンパク質の性状を解析したところ、標準品としては不適であることがわかった（菊池）。ウシ

プリオントの高感度バイオアッセイ系として、あるいはプリオント病発症機構の解明に使えるウシプリオント遺伝子改変マウスの作製を行い、ファウンダー 4 系統を作出した。うち 1 系統でヘテロに遺伝子をもつマウスでは脳内接種後 104 日で脾臓にプリオントが検出された。プリオント遺伝子ホモマウスおよびほか 3 系統は検討中である（松田潤）。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明

わが国で発見された BSE プリオントの生物学的性状について近交系マウスに接種して解析したところ、英國例と類似した糖鎖型および分子量が認められた。ほかの BSE 例についても検討中で、ウシ遺伝子改変マウスでの感染実験も進行中である（品川）。ウシとヒツジの PrP 遺伝子多型について検討したところ、667 頭のウシでは 6 回のオクタリピートをもつウシは 595 頭で、234 番と 576 番に塩基置換がみられたが、アミノ酸置換はみられなかった。転写調節領域で 12 塩基欠失例は 49/126 頭であった。ヒツジではスクレイピー感受性を示す 136 番バリンをもつものは少なかった（石黒）。プリオント病の早期診断および感染・発症機構の解明を目的として、マイクロアレイによる発現遺伝子プロファイリングを行った（三好）。Doppel 蛋白非産生の 1 型プリオント遺伝子欠損マウスから神経細胞株を樹立し、種々の動物プリオント遺伝子を導入し、培養細胞での感染実験が可能となった（小野寺）。ウシプリオント遺伝子改変マウスでは脾臓の二次濾胞にプリオントの発現がみられ、蟻酸や塩酸処理で消失した（高橋）。BSE 疑似患畜 15 頭について定期的に臨床症状、血液、髄液、尿を採取し検討を行ったがとくに異常は見られなかった。9 頭の子牛に BSE プリオントを脳内接種した。1 頭が 2 日後に死亡したが、残りについて実験中である（森）。カニクイサルを用いた BSE プリオント感染モデルの作製により変異型 CJD の病態解明および早期診断法を開発すること、および経時的に採取した血液、髄液、および主要組織を研究班の研究資源化することを目的としてサルに BSE プリオントを接種した。3 ないし 6 ヶ月後の安樂死

サルおよび経過観察中のサルではとくに異常は認められなかった（寺尾）。

3) 食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発

と畜時の脳・脊髄組織による食肉等への汚染防止法の開発を目的とし、と畜時のスタンニング、ピッシング操作、背割り位置と神経組織汚染との関連について、枝肉、ブロック肉、市販食肉を用い、GFAP をマーカーとして、全国 8 力所の食肉衛生検査所で検討した。ピッシングやスタンニングによる血液への神経組織の混入についてはすべて検出限界以下であった。枝肉の内側と頭側で陽性検体が認められ、背割り時の汚染による神経組織の残留が枝肉洗浄後でも存在することがわかった。ブロック肉には 3/11 に陽性となったが、市販食肉ではすべて陰性であった。と畜方法について 137 施設にアンケートを実施したところ、頭蓋に穴をあけるスタンニングはすべて、ピッシングは 73% で、背割り前の脊髄吸引で 60% 以上取られているのが 60%、正中での背割りは 94%、自動高圧洗浄装置による枝肉の洗浄は 38% で行われていた。神経組織汚染は正中での背割りによるもので、正中からずらした背割り法の普及が必要と考えられた（佐々木）。

D. 考 察

1) プリオンの高感度・迅速検査法の開発

スクリーニング検査として期待される蛍光相関分光法の小型装置が完成し、来年度にデータを取ることが可能となった。一方、抗プリオンモノクローナル抗体が開発され、本報告書に記載はないが、いくつかの ELISA キットが作製されつつあり、来年度にはデータの比較が可能となろう。新規のモノクローナル抗体も開発されつつあり、うまく使うことでわが国の BSE 例の解析が進むと思われる。確認検査で使われる病理・免疫組織化学法の改良が進み、迅速化が可能となり、また高感度化を目指した抗原賦活化法も開発された。リンタングステン酸を用いるウエスタンプロット法も実用化され、実際の診断に応用された。本年度、とくに強調したいのはウシ遺伝子改変マウスが順調に作製さ

れ、脳内接種により 104 日後に脾臓でプリオンが検出されたことである。現在もあらたな系統が作製されつつあり、来年度には初期の目標を達成できる可能性が高くなつた。したがつて、この分野の研究は順調な進捗状況にあると考えられ、来年度の成果が期待できる。

2) 海綿状脳症に関する感染牛由来材料及び実験動物を用いた感染および発症機構の解明

免疫化学的方法でのプリオンの検出のみならず、動物への伝達性（感染性）と性状解析の研究は重要である。本年度にその一部の結果がでた。わが国の BSE 例は 11 例となつたが、現在ではそのうちの 9 例までがマウスへの接種により検討中である。ウシプリオン遺伝子改変マウスへの接種も始まり、生化学的および病理学的解析が進んでるので、この分野の研究成果は来年度にはほぼ出そろい、わが国の BSE の性状が明らかにできると思われる。

ウシやヒツジのプリオン遺伝子解析が進み、BSE 例に特徴はみられなかつたが重要な基礎データとなる。マイクロアレイによる解析は初期段階にあるが、興味ある結果が期待される。培養細胞での解析法の開発は将来重要な手段となる。

マウスのみならず、ウシへの感染実験がわが国でも始まり、サルへの感染実験と相まって、世界でも少ない BSE プリオンの動物実験が開始された。これらの感染実験には時間がかかり、来年度には結果はでないとも思われるが、研究資源の蓄積により、新たな解析方法が開発された際には重要なサンプルとなり、研究の広がりを促進できるであろう。そのため、研究資源の管理・配布の原則についてマニュアル化を進めている。

3) 食品の安全性を図るための有効な食肉汚染防止法の開発

と畜時における大脳や脊髄神経組織の食肉への汚染防止法の開発は一方で重要な問題である。今回の多施設での検討方法の確立とその結果や問題点の把握により新しい安全なと畜法の開発および普及につながつていくものと期待される。