

20010056

厚生科学研究費補助金 厚生科学特別研究事業

牛海綿状脳症（BSE）に関する研究

平成13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 品川 森一

平成14年(2002)年4月

目 次

． 総括研究報告書	
牛海綿状脳症（BSE）に関する研究	1
品川森一	
． 分担研究報告書	
1．牛 BSE 及び羊・山羊スクレイピーのサーベイランス	4
品川 森一（帯広畜産大学 獣医公衆衛生）	
2． BSE サーベイランス確定検査用迅速ウエスタンブロット法の プロトコール化	13
堀内 基広（帯広畜産大学原虫病研究センター、獣医公衆衛生）	
3．免疫組織化学による BSE 感染牛の検査	22
古岡 秀文（帯広畜産大学 家畜病理学）	
4．食肉の神経組織による汚染防止に関する研究	24
沢谷 広志（神奈川県食肉衛生検査所）	
． 研究成果の刊行に関する一覧表	59
． 研究成果の刊行物・別刷り	

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

牛海綿状脳症（BSE）に関する研究

主任研究者 品川 森一 帯広畜産大学 獣医公衆衛生学

研究要旨

- 1 神経症状を呈した牛207頭は全て BSE の異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 2 検査した18ヶ月齢以上の羊22頭及び山羊2頭はそれぞれスクレイビーの異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 3 全頭検査で2頭が BSE の異常プリオン蛋白陽性であった。
- 4 ウェスタンブロット法の簡便化および迅速化を行い、所要時間およそ8時間、現行 ELISA の4倍以上の高感度化が実現し、プロトコールを作製した。
- 4 免疫組織化学的診断法の迅速法を開発し、積算時間12時間までに迅速化した。本法を用いて、2頭の BSE 陽性牛の確定診断を行った。プロトコールを作製した。
- 5 背割り前の脊髄除去法と脊髄汚染を調べ、吸引式で脊髄除去率が高いものは汚染は低い、硬膜が残存し、大阪押出式は、脊髄の除去率が高いが汚染も高い傾向があった。千葉改良押出式は脊髄の除去率が高く汚染は低い傾向があった。吸引式と押出式の優劣を付けられなかった。
事前の脊髄除去は枝肉への脊髄組織の付着防止上で有効で、十分な枝肉洗浄併用により、枝肉の脊髄組織汚染・残留を防止できる。
- 6 ビッシングによる中枢神経組織の血液中への混入は大部分が陰性であったが、検出限界を越すものが少数存在し、ビッシングによる中枢神経組織の血液中への混入はないと結論できなかつた。
- 7 海外文献情報から、BSE の羊及び山羊発生の危険性が危惧され、それらの特定危険部位とその除去を決定した。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関
における職名

品川 森一・帯広畜産大学・教授
堀内 基広・帯広畜産大学・助教授
古岡 秀文・帯広畜産大学・助教授
沢谷 広志・神奈川食肉衛生検査所・所
長

A. 研究目的

我が国では過去にEUからの牛および肉骨粉の輸入があったこと、および羊のスクレイビーが散発していることから、我が国におけるBSEおよび羊スクレイビーの存在状況に関する正確な情報を得ることを目的としてサーベイランスを実施する。

本年9月には国産牛での発生が報告され、屠殺牛の全頭検査が開始された。そこで、と畜場でと殺解体され、スクリーニング検査（ELISA）において陽性と判定された牛を対象に、確認検査を実施するウェスタンブロット法及び免疫組織化学の迅速化と高感度化を計り、プロトコールの作製を目的とした。

さらに、牛の特定危険部位（脳、眼、脊髄、回腸遠位部）を確実に除去できる手法及び特定危険部位が可食部に付着しないと

畜・解体方法について研究・開発するとともに、これらの部位の可食部への汚染状況等を調査・検証することにより、食肉の安全性の確保を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1 プリオン病調査

全国各地のと畜場に搬入された牛で神経症を示すもの、および18ヶ月齢以上の羊及び山羊を対象にウェスタンブロット法によるBSE及びスクレイビーの検査を行い、BSE及びスクレイビーに関する疫学研究を行った。全頭検査開始後はELISAによるスクリーニング検査で陽性と判定されたものを対象に、確認検査としてウェスタン・ブロット法、病理組織学的検査、免疫組織化学的検査等を行い、最終的に専門家による確定診断を実施するとともに、と畜検査員への技術移転を行った。

2 と畜・解体法等の研究・開発

諸外国におけるBSE診断法に関する情報を収集し、診断に関するマニュアルを作成するとともに、モデルとなると畜場を選定し、と畜・解体作業における特定危険部位（脳、眼、脊髄、回腸遠位部）の除去方法等について、諸外国における実態等を参考に、わが国のと畜場に見合った簡便かつ迅

速な手法について開発した。

特に、背割り工程による枝肉への脊髄の飛散については、脊髄組織に多く含まれる GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein グリア細胞繊維性酸性タンパク質) を ELISA 法により検出し、適切な背割りの方法を開発・検証するとともに、枝肉への脊髄の付着状況、トリミング肉への残留状況等について調査した。

3 都道府県において実施しているスクリーニング検査に対する外部精度管理の実施

都道府県の食肉衛生検査所において実施しているスクリーニング検査 (ELISA 法) 結果の信頼性を確保するため、外部精度管理を実施する。

(倫理面への配慮)

実験動物使用時は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施し、使用動物数は必要最小限に止めた。

C. 研究結果

1 神経症状を呈した牛207頭を検査し、全て BSE の異常プリオン蛋白は陰性であった。検査した18ヶ月齢以上の羊22頭及び山羊2頭はそれぞれスクレイビーの異常プリオン蛋白は陰性であった。

2 全頭検査で ELISA 陽性で確認検査を行った検体の内、2頭が BSE の異常プリオン蛋白陽性であった。

3 帯広畜産大学で確立されたウェスタンブロット法による PrP^{Sc} の検出法を基に、簡便化および迅速化を行い、所要時間およそ8時間、一次スクリーニングで使用されている ELISA に比べ4倍以上と、迅速化及び高感度化が実現した。均一な確定検査を可能にするためにプロトコル化を行った。

4 免疫組織化学的診断法の迅速化の開発を行い、検査の精度を保ったまま、積算時間12時間までに迅速化した。開発された迅速診断法を用いて、確定診断を行い、2頭の BSE 陽性牛の確定診断を行った。均一な確定検査を可能にするためにプロトコル化を行った。

5 背割り前の異なる脊髄除去法と各方法によって処理された枝肉等の脊髄汚染を、神経組織のグリア細胞に特異的な GFAP を指標に調べ比較した。吸引式で、脊髄除去率が高いものは汚染は低い、硬膜が残存し、大阪押出式は、脊髄の除去率は高いが汚染も高い傾向があった。押出圧力を改良した千葉押出式は、

脊髄の除去率が高いが汚染は低い傾向があった。即ち、今回の調査では、吸引式及び押出式の優劣を付けられなかった。しかし、事前に脊髄除去をすることは枝肉への脊髄組織の付着を防止する上で有効であり、かつ枝肉洗浄を十分行うことにより、枝肉への脊髄組織付着及び残留を防止できるとの結論が得られた。

6 ビッシングによる中枢神経組織の血液中への混入の調査で、大部分は検出限界以下であったが、わずかに検出限界を越すものが少数存在した。採血時の技術的な問題か、ELISA 法の疑陽性か判定できなかったため、ビッシングによる中枢神経組織の血液中への混入はないと結論できなかった。

6. 班員外の専門家を加えた研究会会議を5回開催し、BSE の診断法の検討、背割りと脊髄の汚染を検討した。また、汚染飼料による羊 BSE の発生の危険性が文献検索で明らかとなり、羊及び山羊の特定危険部位とその除去を決定した。

D. 考察

1 BSE のパッシブサーベイランスでは検査頭数が207頭と少数で、陽性個体を検出できなかった。全頭検査が実施され、2ヶ月以内に2頭が BSE 陽性と判定された。BSE 発生の情報により、高齢牛の屠畜場への出荷制限あるいは自主規制が行われて居ると聞く。この所為か、以後4ヶ月経ても陽性例が見つからない。食肉の安全性確保の上で全く問題はないが、正確に我が国の BSE の状況を把握すると言う点では問題である。

羊及び山羊のスクレイビーのアクティブサーベイランスの結果も全て陰性であった。過去において、我が国のスクレイビー汚染は特定の地域以外は殆ど無く、汚染牧場での羊飼養が放棄されたり、我が国全体の羊飼養頭数が激減したことから、国内全体の汚染は極くわずかと推定される。このため、今回のサーベイランスでは陽性例が検出できなかったであろう。

2 BSE の確認検査に用いられるウェスタンブロット法が改良され、迅速化してサーベイランスに用いられる ELISA 法より感度が高いことは、確認検査の有効性を保証するもので、免疫組織化学による検査法も飛躍的に迅速化と共に食肉の安全性を確保するうえで重要な点である。

3 今回の背割りによる脊髄組織による枝肉の汚染調査から、あらかじめ脊髄を

除去することが、汚染の防止に重要なことが明らかとなった。脊髄除去の方法は大きくわけて吸引法と押し出し法がある。何れが良いか結論が出なかった。ピッシングによる血液の中樞神経系組織の混入に付いては結論が得られなかった。ピッシングの中止について論議するためには更なる検討が行われる必要がある。

E. 結論

- 1 神経症状を呈した牛207頭は全てBSEの異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 2 検査した18ヶ月齢以上の羊22頭及び山羊2頭はそれぞれスクレイビーの異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 3 全頭検査で2頭が BSE の異常プリオン蛋白陽性であった。
- 4 ウェスタンブロット法の簡便化および迅速化を行い、所要時間およそ8時間、現行 ELISA の4倍以上の高感度化が実現し、プロトコルを作製した。
- 5 免疫組織化学的診断法の迅速法を開発し、積算時間12時間までに迅速化した。本法を用いて、2頭の BSE 陽性牛の確定診断を行った。プロトコルを作製した。
- 6 脊髄除去法と枝肉等の脊髄汚染を調べて、吸引式と押し出し式の優劣が付けられなかった。
事前の脊髄除去は枝肉への脊髄組織の付着防止上で有効で、十分な枝肉洗浄併用により、枝肉の脊髄組織汚染・残留を防止できる。
- 7 ピッシングにより中樞神経組織の血液中への混入は大部分が陰性であったが、ピッシングによる中樞神経組織の血液中への混入はないと結論できなかった。
- 8 BSE プリオン汚染飼料による羊及び山羊の発症の可能性が認められ、特定危険部位が決定されその除去が必要と委員会で結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.
- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L-W. and Caughey, B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol.*

Chem., 276: 15489-15497.

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)

品川森一、堀内基広、松井高峯(2001) プリオンの免疫学的検出法 *生活衛生* 45: 259-269.

池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 *食品衛生研究* 52: 33-42.

堀内基広 (2001) 動物のプリオン病 ウイルス 51: 145-150

2. 学会発表

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴルの羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP 合成ペプチドによる PrP 分子相互作用の阻害 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊 PrP 遺伝子 Tg マウスの羊スクレイビープリオンに対する感受性 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製 PrP^{Sc} 画分と特異的に反応する mAb 6H10 の解析 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体パネルの作製 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋白質検出法の開発 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

牛 BSE 及び羊・山羊スクレイピーのサーベイランス

分担研究者 品川 森一 帯広畜産大学獣医公衆衛生学教授

研究要旨

我が国で BSE の発生が認められ、屠畜場における BSE の全頭検査が開始されるまで、屠畜場に搬入され、屠殺された神経症状を呈する牛を対象に BSE のサーベイランスを実施した。また、同時に、18 ヶ月齢以上の羊と山羊を対象にスクレイピーのサーベイランスを行った。期間中にあ検査した 207 頭及び羊 22 頭、山羊 2 頭はそれぞれ BSE 及びスクレイピーが陰性であった。全頭検査で ELISA 陽性で確認検査を行った検体の内、2 頭が BSE の異常プリオン蛋白陽性であった。海外文献情報から、BSE の羊及び山羊発生の危険性が危惧され、それらの特定危険部位とその除去を決定した。

A. 研究目的

我が国は少量ながら BSE 汚染が疑われる肉骨粉を輸入した実績がある。類似した状況に置かれた EU 諸国で検査が実施されるにつれて BSE の発生国が増加した。我が国の食肉の安全性を確保するため、また我が国の BSE の状況を把握することを目的として、屠畜場に搬入された牛で神経症状を示すものを対象とした BSE 検査を計画した。また、我が国には稀ではあるが羊のスクレイピーの発生が認められる。そこで、羊及び山羊のスクレイピー検査を合わせて実施することを計画した。

B. 研究方法

検査対象組織：屠畜場に搬入されて屠殺された牛で、神経症状が疑われた個体の中枢神経組織及び 18 ヶ月齢以上の羊及び山羊の中枢神経組織及び扁桃の採取と送付を全国の食肉検査所に依頼した。

検査方法：従来から実施していた試料調整法 (J. Virol. Methods, 64: 205-216, 1997) に従い試料を調整し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白の検出を行った。本法の検出感度は、スクレイピー感染マウス脳で調べた場合、0.5~1 μ g の脳中の異常プリオン蛋白が検出できる程度である。使用抗体 B103 は種特

異性が殆どなく、マウス、羊及び牛プリオン蛋白と同等に反応する。

（倫理面絵の配慮）

屠畜場で屠殺された動物の組織を対象としているため、実験動物にかかわる問題は無い。

C. 研究結果

検査対象となった牛 207 頭の臨床所見は大多数が起立不能で運動障害、関節炎、後軀麻痺、腰萎等も見られた。年齢不明が 18 頭、30 ヶ月齢以下が 25 頭、年齢が明らかで 30 ヶ月以上が 164 頭で、その内 4 歳以上でホルスタインの廃用牛と推定されるものが 126 頭を占めた。これらからウエスタンブロット法によって異常プリオン蛋白は検出できなかった。サーベイランスの成績を表 1 に示す。

羊 22 頭及び山羊 2 頭は何れも臨床的に異常が無かった。最若齢羊は 22 ヶ月齢で、残りは 3 歳以上であった。これらからも異常プリオン蛋白は検出できなかった。サーベイランスの成績を表 2 に示す。

班員外の専門家を加えた研究班会議を 5 回開催し、BSE の診断法の検討、背割りと脊髄の汚染を検討した。また、汚染飼料による羊 BSE の発生の危険性が文献検索で明らかとなり、羊及び山羊の特定危険部位を決定した。

II 分担研究報告書

D. 考察

BSEは3~6歳で多くが発症している。全頭検査の開始によって5歳のホルスタイン牛2頭に異常プリオン蛋白が検出された。今回の調査に4歳以上でホルスタインの廃用牛と推定されるものが126頭含まれていたが、陽性例はなかった。絶対数が少ない今回の成績と、全頭検査の成績を合わせても、我が国のBSEの汚染状況を推定することは困難である。また現在我が国で行われている食肉検査所の検査は食肉の安全性の確保のためには非常に有効であるが、家畜保健衛生所の担当する検査と同様に検査対象試料の点でBSEの汚染状況を把握するためには不十分と考えられる。

E. 結論

屠畜場で屠殺され神経症状を呈する牛を対象に昨年10月18日までBSEのサーベイランスを実施し、検査した牛羊及び山羊の合計231頭は異常プリオン陰性であった。

羊及び山羊のBSEの発生の危険性が私的され、特定危険部みの決定と除去が決められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)

品川森一、堀内基広、松井高峯(2001) プリオンの免疫学的検出法 *生活衛生* 45巻 259-269.

池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 *食品衛生研究* 52巻 33-42.

2. 学会発表

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴルの羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型

第131回日本獣医学会学術集会(東京) 2001年4月

堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP合成ペプチドによるPrP分子相互作用の阻害 第131回日本獣医学会学術集会(東京) 2001年4月

山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エボキシ化合物によるプリオン不活化 第131回日本獣医学会学術集会(東京) 2001年4月

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊PrP遺伝子Tgマウスの羊スクレイビープリオンに対する感受性 第49回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2001年11月

狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製PrP^{Sc}画分と特異的に反応するmAb6H10の解析 第49回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2001年11月

金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体パネルの作製 第49回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2001年11月

毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋白質検出法の開発 第49回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2001年11月

表1.

牛海綿状脳症サーベイランス実績

No.	検体採取 年月日	採取動物に関する情報					実施日	検査結果		備考
		種類	性別	品種	年齢	臨床症状		と殺年月日	WB	
1	13.6.6	牛	牝	ホルスタイン	6才	ダウンー症候群	13.6.6	13.8.31	陰性	尿毒症
2	13.6.8	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13.6.8	13.8.31	陰性	
3	13.6.27	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13.6.27	13.8.31	陰性	
4	13.6.11	牛	牝	黒毛和種	14才	運動障害	13.6.11	13.8.31	陰性	
5	13.6.12	牛	去勢	黒毛和種	28ヶ月	知覚障害	13.6.12	13.8.31	陰性	
6	13.6.12	牛	去勢	黒毛和種	28ヶ月	知覚障害	13.6.12	13.8.31	陰性	
7	13.6.5	牛	牝	ホルスタイン	25ヶ月	運動障害	13.6.5	13.8.31	陰性	
8	13.6.8	牛	牝	ホルスタイン	7才	運動障害	13.6.8	13.8.31	陰性	
9	13.6.11	牛	牝	ホルスタイン	4才	運動障害	13.6.11	13.8.31	陰性	
10	13.6.13	牛	牝	ホルスタイン	5才	運動障害	13.6.13	13.8.31	陰性	
11	13.6.13	牛	牝	ホルスタイン	28ヶ月	運動障害	13.6.13	13.8.31	陰性	
12	13.6.8	牛	牝	ホルスタイン	3才	運動障害	13.6.8	13.8.31	陰性	
13	13.6.15	牛	牝	ホルスタイン	6才	運動障害	13.6.15	13.8.31	陰性	
14	13.6.15	牛	牝	黒毛和種	2才	起立不能	13.6.15	13.8.31	陰性	両股関節脱臼
15	13.6.18	牛	牝	黒毛和種	不明	起立困難	13.6.18	13.8.31	陰性	トラックから落下
16	13.6.19	牛	牝	黒毛和種	2才5ヶ月	起立困難	13.6.19	13.9.10	陰性	左前骨折
17	13.6.19	牛	牝	ホルスタイン	不明	起立困難	13.6.19	13.9.10	陰性	水腫全癒
18	13.6.21	牛	牝	ホルスタイン	4才4ヶ月	起立困難	13.6.21	13.9.10	陰性	筋肉変性核廃
19	13.6.22	牛	牝	ホルスタイン	4才11ヶ月	起立不能	13.6.22	13.9.10	陰性	産後起立不能
20	13.6.25	牛	牝	黒毛和種	1才4ヶ月	起立困難	13.6.25	13.9.10	陰性	両臀部打撲
21	13.6.26	牛	牝	ホルスタイン	不明	起立不能	13.6.26	13.9.10	陰性	大腿部筋断裂
22	13.6.26	牛	牝	黒毛和種	推定3才	起立不能	13.6.26	13.9.10	陰性	繋留所で転倒
23	13.6.26	牛	牝	黒毛和種	推定3才	起立不能	13.6.26	13.9.10	陰性	繋留所で転倒
24	13.6.27	牛	牝	ホルスタイン	7才1ヶ月	起立困難	13.6.27	13.9.10	陰性	両股関節炎
25	13.6.27	牛	牝	ホルスタイン	6才5ヶ月	起立不能	2013.6.27	13.9.10	陰性	水腫核廃
26	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン		関節炎、肝炎	13.6.28	13.9.10	陰性	
27	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン		ダウンー症候群	13.6.28	13.9.10	陰性	
28	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン		投関節脱臼	13.6.28	13.9.10	陰性	
29	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン	5才11ヶ月	産後起立不能	13.6.28	13.9.10	陰性	
30	13.6.29	牛	牝	ホルスタイン	3才8ヶ月	関節炎	13.6.29	13.9.10	陰性	高度水腫全癒
31	13.6.29	牛	牝	ホルスタイン	2才3ヶ月	関節炎	13.6.29	13.9.10	陰性	両股関節炎
32	13.6.29	牛	牝	ホルスタイン	2才1ヶ月	投関節脱臼	13.6.29	13.9.10	陰性	筋肉変性核廃
33	13.6.12	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13.6.12	13.8.31	陰性	
34	13.6.12	牛	牝	ホルスタイン	3才	起立不能	13.6.12	13.8.31	陰性	
35	13.6.13	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立困難	13.6.13	13.8.31	陰性	
36	13.6.13	牛	牝	ホルスタイン	3才	起立困難	13.6.13	13.8.31	陰性	
37	13.6.14	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13.6.14	13.8.31	陰性	
38	13.6.14	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13.6.14	13.8.31	陰性	

表1. 続き

No.	検体採取		採取動物に関する情報					実施日	検査結果		備考
	年月日	種類	性別	品種	年齢	臨床症状	と殺年月日		WB	ELISA	
									陰性		
39	13.6.13	牛	牝	ホルスタイン	3才	起立不能	13.6.13	13.8.20	陰性		
40	13.6.13	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能、後肢麻痺	13.6.13	13.8.20	陰性		
41	13.6.14	牛	牝	ホルスタイン	9才	起立不能、四肢伸長	13.6.14	13.8.20	陰性		
42	13.6.15	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13.6.15	13.8.20	陰性		
43	13.6.18	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13.6.18	13.8.31	陰性		
44	13.6.18	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13.6.18	13.8.20	陰性		
45	13.6.18	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13.6.18	13.8.20	陰性		
46	13.6.19	牛	去勢	F1	2才	起立不能	13.6.19	13.8.20	陰性		
47	13.6.19	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13.6.19	13.8.20	陰性		
48	13.6.19	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13.6.19	13.8.20	陰性		
49	13.6.19	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13.6.19	13.8.20	陰性		
50	13.6.19	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13.6.19	13.8.20	陰性		
51	13.6.19	牛	牝	ホルスタイン	2才	起立不能	13.6.19	13.8.31	陰性		
52	13.6.20	牛	牝	ホルスタイン	13才	起立不能	13.6.20	13.8.31	陰性		
53	13.6.20	牛	牝	ホルスタイン	9才	起立不能	13.6.20	13.8.31	陰性		
54	13.6.22	牛	牝	F1	2才	起立不能、血便	13.6.22	13.8.31	陰性		
55	13.6.25	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能、後肢脱力	13.6.25	13.8.31	陰性		
56	13.6.25	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能、後肢脱力	13.6.25	13.8.31	陰性		
57	13.6.26	牛	去勢	黒毛和種	3才	起立不能	13.6.26	13.8.31	陰性		
58	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13.6.28	13.8.31	陰性		
59	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能、子宮脱	13.6.28	13.8.31	陰性		
60	13.6.28	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能、削腹	13.6.28	13.8.31	陰性		
61	13.7.3	牛	牝	ホルスタイン	9才	起立不能、削腹	13.7.3	13.8.31	陰性		
62	13.7.4	牛	牝	ホルスタイン	14才	起立不能、削腹	13.7.4	13.8.31	陰性		
63	13.7.5	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能、横臥	13.7.5	13.8.31	陰性		
64	13.7.4	牛	牝	ホルスタイン	不明	起立不能	13.7.4	13.9.12	陰性		
65	13.7.5	牛	牝	ホルスタイン	不明		13.7.5	13.9.12	陰性		
66	13.7.6	牛	牝	黒毛和種	2才7ヶ月	腰萎	13.7.6	13.9.12	陰性		
67	13.7.6	牛	牝	ホルスタイン	不明		13.7.6	13.9.13	陰性		
68	13.7.6	牛	牝	黒毛和種	不明		13.7.6	13.9.13	陰性		
69	13.7.10	牛	牝	ホルスタイン	5才10ヶ月	起立不能	13.7.10	13.9.13	陰性		
70	13.7.11	牛	牝	ホルスタイン	7才3ヶ月	関節炎	13.7.11	13.9.13	陰性		
71	13.7.11	牛	牝	ホルスタイン	5才9ヶ月	関節炎	13.7.11	13.9.13	陰性		
72	13.7.12	牛	牝	黒毛和種	不明	股関節脱臼	13.7.12	13.9.13	陰性		
73	13.7.13	牛	牝	ホルスタイン	不明	股関節脱臼	13.7.13	13.9.13	陰性		
74	13.7.13	牛	牝	ホルスタイン	3才3ヶ月	股関節脱臼	13.7.13	13.9.13	陰性		
75	13.7.16	牛	牝	ホルスタイン	8才	クワン症候群	13.7.16	13.9.13	陰性		
76	13.7.17	牛	去勢	黒毛和種	3才3ヶ月	腰萎	13.7.17	13.9.13	陰性		

表1. 続き

No.	検体採取 年月日	採取動物に関する情報						実施日	検査結果		備考
		種類	性別	品種	年齢	臨床症状	と殺年月日		WB	ELISA	
77	13. 7. 17	牛	牝	ホルスタイン	4才6ヶ月	腰萎	13. 7. 17	13. 9. 13	陰性		
78	13. 7. 18	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13. 7. 18	13. 9. 13	陰性		
79	13. 7. 18	牛	牝	ホルスタイン	不明	起立不能	13. 7. 18	13. 9. 13	陰性		
80	13. 7. 18	牛	牝	黒毛和種	12才8ヶ月	中足骨骨折	13. 7. 18	13. 9. 13	陰性		
81	13. 7. 18	牛	牝	ホルスタイン	3才5ヶ月	起立不能	13. 7. 18	13. 9. 13	陰性		
82	13. 7. 19	牛	牝	ホルスタイン	4才7ヶ月	起立不能	13. 7. 19	13. 9. 13	陰性		
83	13. 7. 19	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 7. 19	13. 9. 13	陰性		
84	13. 7. 19	牛	牝	ホルスタイン	3才6ヶ月	起立不能	13. 7. 19	13. 9. 14	陰性		
85	13. 7. 24	牛	牝	ホルスタイン	7才11ヶ月	起立不能	13. 7. 24	13. 9. 14	陰性		
86	13. 7. 24	牛	牝	ホルスタイン	不明	起立不能	13. 7. 24	13. 9. 14	陰性		
87	13. 7. 26	牛	去勢	黒毛和種	1才8ヶ月	起立困難	13. 7. 19	13. 9. 14	陰性		
88	13. 7. 27	牛	牝	ホルスタイン	不明	起立不能	13. 7. 27	13. 9. 14	陰性		
89	13. 7. 27	牛	牝	ホルスタイン	3才11ヶ月	起立不能	13. 7. 27	13. 9. 14	陰性		
90	13. 7. 27	牛	牝	ホルスタイン	5才9ヶ月	起立不能	13. 7. 27	13. 9. 14	陰性		
91	13. 6. 8	牛	牝	黒毛和種	6才	起立不能	13. 6. 8	13. 9. 10	陰性		
92	13. 6. 16	牛	牝	ホルスタイン	2才	起立不能	13. 6. 16	13. 9. 10	陰性		
93	13. 7. 18	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 7. 18	13. 8. 31	陰性		
94	13. 7. 24	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13. 7. 24	13. 9. 10	陰性		
95	13. 7. 31	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13. 7. 31	13. 9. 10	陰性		
96	13. 7. 26	牛	牝	ホルスタイン	5才	運動障害	13. 7. 26	13. 9. 12	陰性		
97	13. 7. 27	牛	牝	ホルスタイン	7才	第4翼右方変位	13. 7. 27	13. 9. 12	陰性		
98	13. 7. 9	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 7. 9	13. 9. 10	陰性		
99	13. 7. 10	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13. 7. 10	13. 9. 10	陰性		
100	13. 7. 10	牛	牝	黒毛和種	7才	起立不能	13. 7. 10	13. 9. 10	陰性		
101	13. 7. 11	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能、前駆脱力	13. 7. 11	13. 9. 10	陰性		
102	13. 7. 13	牛	牝	ホルスタイン	10才	起立不能	13. 7. 13	13. 9. 10	陰性		
103	13. 7. 16	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 7. 16	13. 9. 12	陰性		
104	13. 7. 17	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13. 7. 17	13. 9. 12	陰性		
105	13. 7. 17	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能、後駆麻痺	13. 7. 17	13. 9. 12	陰性		
106	13. 7. 18	牛	牝	ホルスタイン	3才	起立不能	13. 7. 18	13. 9. 12	陰性		
107	13. 7. 23	牛	牝	ホルスタイン	9才	起立不能	13. 7. 23	13. 9. 12	陰性		
108	13. 7. 23	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13. 7. 23	13. 9. 12	陰性		
109	13. 7. 23	牛	去勢	黒毛和種	3才	起立不能	13. 7. 23	13. 9. 12	陰性		
110	13. 7. 24	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13. 7. 24	13. 9. 12	陰性		
111	13. 7. 26	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 7. 26	13. 9. 12	陰性		
112	13. 7. 27	牛	牝	ホルスタイン	6才	後駆麻痺、犬座姿勢	13. 7. 27	13. 9. 12	陰性		
113	13. 7. 30	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 7. 30	13. 9. 12	陰性		
114	13. 8. 1	牛	牝	ホルスタイン	9才	起立不能、割腹	13. 8. 1	13. 9. 12	陰性		

表1. 続き

No.	検体採取 年月日	採取動物に関する情報						実施日	検査結果		備考
		種類	性別	品種	年齢	臨床症状	と殺年月日		WB	ELISA	
115	13. 8. 1	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能、削履	13. 8. 1	13. 9. 12	陰性		
116	13. 8. 2	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能、伏臥	13. 8. 2	13. 9. 14	陰性		
117	13. 8. 2	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13. 8. 2	13. 9. 14	陰性		
118	13. 8. 2	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13. 8. 2	13. 9. 14	陰性		
119	13. 8. 7	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 8. 7	13. 9. 14	陰性		
120	13. 8. 9	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 9	13. 9. 14	陰性		
121	13. 8. 9	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 9	13. 9. 14	陰性		
122	13. 8. 13	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 13	13. 9. 14	陰性		
123	13. 8. 17	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能、削履	13. 8. 17	13. 9. 14	陰性		
124	13. 8. 20	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13. 8. 20	13. 9. 14	陰性		
125	13. 8. 20	牛	牝	ホルスタイン	11才	起立不能	13. 8. 20	13. 9. 18	陰性		
126	13. 8. 20	牛	牝	ホルスタイン	12才	起立不能	13. 8. 20	13. 9. 18	陰性		
127	13. 8. 20	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能、後肢脱力	13. 8. 20	13. 9. 18	陰性		
128	13. 8. 21	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 21	13. 9. 18	陰性		
129	13. 8. 21	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 21	13. 9. 18	陰性		
130	13. 8. 22	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 22	13. 9. 18	陰性		
131	13. 8. 22	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13. 8. 22	13. 9. 18	陰性		
132	13. 8. 23	牛	牝	ホルスタイン	9才	起立不能	13. 8. 23	13. 9. 18	陰性		
133	13. 8. 24	牛	牝	ホルスタイン	11才	起立不能	13. 8. 24	13. 9. 18	陰性		
134	13. 8. 29	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13. 8. 29	13. 9. 27	陰性		
135	13. 8. 30	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能	13. 8. 30	13. 9. 27	陰性		
136	13. 8. 20	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13. 8. 20	13. 9. 14	陰性		
137	13. 8. 20	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13. 8. 20	13. 9. 14	陰性		
138	13. 8. 28	牛	牝	ホルスタイン	6ヶ月	起立不能	13. 8. 28	13. 9. 27	陰性		
139	13. 8. 28	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13. 8. 28	13. 10. 1	陰性		
140	13. 8. 29	牛	牝	ホルスタイン	7才	化膿性関節炎	13. 8. 29	13. 10. 1	陰性		
141	13. 8. 29	牛	牝	ホルスタイン	7才	第4胃右方変位	13. 8. 29	13. 10. 1	陰性		
142	13. 9. 27	牛	牝	ホルスタイン	8才	起立不能(脱臼)	13. 9. 27	13. 10. 5	陰性		
143	13. 9. 27	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能(関節炎)	13. 9. 27	13. 10. 5	陰性		
144	13. 9. 25	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 9. 25	13. 10. 1	陰性		
145	13. 9. 25	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 9. 25	13. 10. 1	陰性		
146	13. 9. 26	牛	牝	ホルスタイン	10才	起立不能	13. 9. 26	13. 10. 1	陰性		
147	13. 9. 12	牛	牝	ホルスタイン	7才9ヶ月	呼吸促進、右横臥にて起立不能、体温40.8℃	13. 9. 12	13. 9. 27	陰性		
148	13. 9. 21	牛	牝	ホルスタイン	5才	後肢開脚による起立不能、体温39.5℃	13. 9. 21	13. 10. 1	陰性		
149	13. 9. 18	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13. 9. 18	13. 9. 27	陰性		
150	13. 9. 27	牛	牡	ホルスタイン	2才	尿毒症	13. 9. 27	13. 10. 5	陰性		去勢
151	13. 9. 25	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13. 9. 25	13. 10. 1	陰性		
152	13. 9. 25	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13. 9. 25	13. 10. 1	陰性		

表1. 続き

No.	検体採取 年月日	採取動物に関する情報						実施日	検査結果		備考
		種類	性別	品種	年齢	臨床症状	と殺年月日		WB	ELISA	
153	13.9.25	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能	13.9.25	13.10.1	陰性		
154	13.9.26	牛	牝	ホルスタイン	3才	起立不能	13.9.26	13.10.1	陰性		
155	13.9.26	牛	牝	ホルスタイン	14才	起立不能	13.9.26	13.10.1	陰性		
156	13.9.26	牛	牝	ホルスタイン	7才	起立不能	13.9.26	13.10.1	陰性		
157	13.9.27	牛	牝	ホルスタイン	2才以上	起立不能	13.9.27	13.10.1	陰性		
158	13.9.27	牛	牝	ホルスタイン	7才以上	起立不能	13.9.27	13.10.1	陰性		
159	13.9.27	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13.9.27	13.10.1	陰性		
160	13.9.20	牛	牝	ホルスタイン	9才	腰萎	13.9.20	13.9.27	陰性		
161	13.9.11	牛	牝	ホルスタイン	5才	産後起立不能	13.9.11	13.9.27	陰性		
162	13.9.13	牛	牝	ホルスタイン	6才	関節炎	13.9.13	13.9.27	陰性		
163	13.9.25	牛	牡	和牛	2才4ヶ月	尿石症、起立難渋	13.9.25	13.9.27	陰性		
164	13.9.26	牛	牡	F1	2才3ヶ月	著変認めず	13.9.26	13.9.27	陰性		
165	13.9.25	牛	牝	黒毛和牛	9才11ヶ月	歩様踴躍	13.9.25	13.10.1	陰性		脂肪壊死症
166	13.9.26	牛	牝	ジャージー	6才	起立不能	13.9.26	13.10.5	陰性		産後起立不能症
167	13.9.28	牛	牝	ホルスタイン	7才6ヶ月	歩様踴躍	13.9.28	13.10.5	陰性		乳房炎
168	13.9.28	牛	去勢	黒毛和牛	2才2ヶ月	起立不能	13.9.28	13.10.5	陰性		股関節脱臼
169	13.9.28	牛	去勢	F1	2才		13.9.28	13.10.5	陰性		尿毒症
170	13.10.1	牛	牡	F1	2才4ヶ月	沈鬱、腹部膨満	13.10.1	13.10.5	陰性		
171	13.9.25	牛	牝	ホルスタイン	5才	起立不能	13.9.25	13.10.5	陰性		
172	13.10.1	牛	牝	ホルスタイン	3才	起立不能	13.10.1	13.10.5	陰性		
173	13.10.1	牛	牝	ホルスタイン	3才9ヶ月	乳房炎	13.10.1	13.10.6	陰性		
174	13.10.1	牛	牝	ホルスタイン	6才2ヶ月	急性乳房炎、起立不能	13.10.1	13.10.6	陰性		
175	13.10.4	牛	牝	ホルスタイン	2才	骨折による起立不能	13.10.4	13.10.6	陰性		
176	13.10.2	牛	去勢	黒毛和牛	2才3ヶ月	異常なし	13.10.2	13.10.6	陰性		
177	13.10.2	牛	牝	黒毛和牛	11才	食欲不振、削そう	13.10.2	13.10.6	陰性		
178	13.10.2	牛	牝	ホルスタイン	4才	食欲不振	13.10.2	13.10.6	陰性		
179	13.10.2	牛	牝	ホルスタイン	6才	関節炎、削そう	13.10.2	13.10.6	陰性		
180	13.10.2	牛	牝	ホルスタイン	4才	起立不能、関節炎	13.10.2	13.10.6	陰性		
181	13.10.2	牛	牝	黒毛和牛	14才	下痢、削そう、食欲不振	13.10.2	13.10.6	陰性		
182	13.10.4	牛	牝	ホルスタイン	2才8ヶ月	起立不能	13.10.4	13.10.6	陰性		腸毒症
183	13.10.5	牛	牝	ホルスタイン	5才11ヶ月	起立不能	13.10.5	13.10.9	陰性		高度の黄疸
184	13.10.5	牛	牝	ホルスタイン	7才	横臥	13.10.5	13.10.9	陰性		
185	13.10.5	牛	牝	ホルスタイン	9才2ヶ月	犬座	13.10.5	13.10.9	陰性		
186	13.10.5	牛	牝	ホルスタイン	7才	乳房炎、起立不能	13.10.5	13.10.9	陰性		
187	13.10.3	牛	牡	黒毛和牛	2才5ヶ月	起立不能	13.10.3	13.10.9	陰性		
188	13.10.3	牛	牝	黒毛和牛	2才	起立不能	13.10.3	13.10.9	陰性		
189	13.10.1	牛	去勢	黒毛和牛	2才7ヶ月	起立不能	13.10.1	13.10.9	陰性		
190	13.10.4	牛	去勢	黒毛和牛	2才5ヶ月	起立不能	13.10.4	13.10.9	陰性		

表1. 続き

No.	検体採取		採取動物に関する情報					実施日	検査結果		備考
	年月日	種類	性別	品種	年齢	臨床症状	と殺年月日		WB	ELISA	
191	13.10.4	牛	牝	和牛	3才4ヶ月	なし	13.10.4	13.10.9	陰性	/	脂肪壊死症
192	13.10.5	牛	牝	ホルスタイン	6才	起立不能	13.10.5	13.10.9	陰性	/	
193	13.10.4	牛	牝	ホルスタイン	6才6ヶ月	起立不能、脂肪肝	13.10.4	13.10.13	陰性	/	
194	13.10.4	牛	牝	ホルスタイン	4才8ヶ月	起立不能、第四胃変位	13.10.4	13.10.13	陰性	/	
195	13.10.8	牛	去勢	黒毛和牛	2才	股関節脱臼	13.10.8	13.10.13	陰性	/	
196	13.10.10	牛	牝	黒毛和牛	2才5ヶ月	排便・排尿閉塞、直腸狭窄	13.10.9	13.10.13	陰性	/	尿毒症
197	13.10.10	牛	牝	黒毛和牛	2才3ヶ月	股関節脱臼	13.10.10	13.10.16	陰性	/	
198	13.10.11	牛	牝	ホルスタイン	8才10ヶ月	股関節炎、産後起立不能	13.10.11	13.10.16	陰性	/	
199	13.10.11	牛	牝	黒毛和牛	2才7ヶ月	腫脹	13.10.11	13.10.16	陰性	/	
200	13.10.12	牛	牝	黒毛和牛	2才9ヶ月	蹄葉炎、起立不能	13.10.12	13.10.16	陰性	/	
201	13.10.12	牛	牝	黒毛和牛	2才5ヶ月	関節炎、左後肢化膿炎	13.10.12	13.10.18	陰性	/	
202	13.10.12	牛	牝	黒毛和牛	8才11ヶ月	下腿骨骨折	13.10.12	13.10.18	陰性	/	
203	13.10.16	牛	牝	ホルスタイン	9才1ヶ月	産後起立不能	13.10.16	13.10.25	陰性	/	

めん羊及び山羊の伝染性海綿状脳症サーベイランス実績

表2.

No.	検体採取		採取動物に関する情報						実施日		検査結果		備考
	年月日	種類	性別	品種	年齢	臨床症状	と殺年月日	実施日	免疫(WB)	免疫(ELISA)			
1	H13.6.14	めん羊	去勢	サフォーク	4才	特になし	H13.6.14	H13.10.25	陰性	/			
2	H13.6.14	めん羊	去勢	サフォーク	4才	特になし	H13.6.14	H13.10.25	陰性	/			
3	H13.7.30	めん羊	牡	サフォーク	5才	正常	H13.7.30	H13.10.25	陰性	/			
4	H13.7.26	めん羊	牡	コリデール	8才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
5	H13.7.26	めん羊	去勢	サホーク	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
6	H13.7.26	めん羊	去勢	サホーク	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
7	H13.7.26	めん羊	牝	コリデール	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
8	H13.7.26	めん羊	牝	サホーク	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
9	H13.7.26	めん羊	牝	サホーク	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
10	H13.7.26	めん羊	牝	サホーク	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
11	H13.7.26	めん羊	牝	コリデール	6才	なし	H13.7.26	H13.7.31	陰性	/			
12	H13.7.16	めん羊	牡	コリデール	3才	なし	H13.7.16	H13.10.25	陰性	/			
13	H13.7.16	めん羊	牝	コリデール	7才	なし	H13.7.16	H13.10.25	陰性	/			
14	H13.7.16	めん羊	牡	コリデール	3才	なし	H13.7.16	H13.10.25	陰性	/			
15	H13.7.16	めん羊	牝	コリデール	7才	なし	H13.7.16	H13.10.25	陰性	/			
16	H13.7.16	めん羊	牝	コリデール	7才	なし	H13.7.16	H13.10.25	陰性	/			
17	H13.9.3	めん羊	牝	サフォーク	3才	正常	H13.9.3	H13.9.27	陰性	/			
18	H13.9.3	めん羊	牝	サフォーク	3才	正常	H13.9.3	H13.9.27	陰性	/			
19	H13.9.3	めん羊	牝	サフォーク	3才	正常	H13.9.3	H13.9.27	陰性	/			
20	H13.9.3	めん羊	牝	サフォーク	3才	正常	H13.9.3	H13.9.27	陰性	/			
21	H13.12.4	めん羊	去勢	サフォーク	22ヶ月齢	特になし	H13.12.4	H13.12.6	陰性	/			
22	H13.12.5	山羊	牡	雑種	75ヶ月齢	著変なし	H13.12.5	H13.12.11	陰性	/			
23	H13.12.5	山羊	牝	雑種	51ヶ月齢	著変なし	H13.12.5	H13.12.11	陰性	/			
24	H14.2.14	めん羊	牝	サフォーク	47ヶ月齢	異常なし	H14.2.14	H14.2.18	陰性	/			

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

BSE サーベイランス確定検査用ウエスタンブロット法のプロトコール化

分担研究者 堀内 基広 帯広畜産大学原虫病研究センター・獣医公衆衛生 助教授

研究要旨

BSE スクリーニングでは、各食肉検査事務所で ELISA による一次スクリーニングで陽性もしくは疑陽性と判定された検体はウエスタンブロットおよび病理組織学的検査による確定検査を行う。確定検査では迅速かつ精度の高い検査が要求される。そこで、我々は当研究室で確立したウエスタンブロットによる PrP^{Sc} の検出法を基に、簡便化および迅速化を目的とした改良を行い、検査実施機関で均一な確定検査を可能にするためにプロトコール化を行った。一次スクリーニングで使用されている ELISA との感度を比較した結果、検出用抗体として B103 を使用した場合、ウエスタンブロットのほうが 4 倍以上感度が高かった。

A. 研究目的

BSE スクリーニング検査一次検査同様、確定検査においても迅速性が要求される。同時に一次検査以前の感度と精度も要求される。そこで、我々が開発した PrP^{Sc} 調製法(J. Virol. Methods, 64: 205-216, 1997)を基本に、確定検査に使用するウエスタンブロット(WB)法の簡略化および高感度化を目的とした改良を試みた。同時に、全国の確定検査実施機関で同等の精度で検査を実施するために WB 法のプロトコール化を試みた。

B. 研究方法

BSE 牛から PrP^{BSE} 粗画分の調製法を短縮化するために、我々が確立した方法(J. Virol. Methods, 64: 205-216, 1997)の各々のステップを再検討した。1) 器械の使用による組織乳剤調整法試料調製の簡便化、2) コラゲナーゼによる前処理の時間の短縮化、3) Proteinase K 処理時間の短縮化、4) 脂質除去および PrP^{Sc} 回収操作の簡便化、について検討し試料調整法の簡便・短縮化を計った。また、WB 法に要する時間の短縮化を目的として、SDS-PAGE の泳動条件、PVDF 膜への転写条件、免疫染色の条件を検討した。

C. 研究結果

試料調製法は最終的に表 1 に示す方法を採用した。この方法は、乳剤作製にマルチビーズショッカーを使用し、コラゲナーゼ処理 30 分、PK 処理 30 分、遠心操作により PrP^{BSE} を回収する際に 2-Butanol-Methanol を加え、脂質除去を行う工程からなる。試料が数検体であれば、試料採取から約 2 時間以内に試料調製が終了する。また、従来 6~15 時間を要していた PVDF 膜への転写を、高電圧下で行うことで、感度を損なうことなく 1~2 時間まで短縮可能であった。

抗原抗体反応による PrP^{BSE} の検出は、通常の間接法を用いた場合 4 時間を要するが、HRP 標識 Fab fragment を用いた直接法を採用することでブロッキングから結果を得るまでの時間を 2 時間半に短縮できた (図 1)。

スパイク試料を用いて、表 1 に示したプロトコールに従った WB と一次検査で使用している ELISA の PrP^{BSE} 検出感度を比較したところ、少なくとも WB は 4 倍以上感度が高かった (図 2)。

完成したプロトコールを図の後に載せる。

D. 考察

BSE スクリーニング一次検査同様、確定検査にも迅速性がもとめられる。同時に、感度・精度も一次検査よりも優れている必要がある。このような必要性能をクリアするウエスタンブロット法のプロトコル化を行ったが、今後、この技術をより一般化するために、更なる改良が必要である。

E. 結論

BSE スクリーニング検査の確定検査に使用するための WB 法のプロトコルを確立した。本法に従うと、6~8 時間で検査が終了する。また、一次検査で使用している ELISA よりも感度が高いことから、確定検査法として十分機能すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L-W. and Caughey, B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.*, 276: 15489-15497.
- Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.
- Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)
- 品川森一、堀内基広、松井高峯 (2001) プリオンの免疫学的検出法 *生活衛生* 45 巻 259-269.
- 堀内基広 (2001) 動物のプリオン病 *ウイルス* 51 巻 145-150.
- 池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 *食品衛生研究* 52 巻 33-42.

2. 学会発表

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴル

- の羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型 第 131 回日本獣医学会学術集会 (東京) 2001 年 4 月
- 堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP 合成ペプチドによる PrP 分子相互作用の阻害 第 131 回日本獣医学会学術集会 (東京) 2001 年 4 月
- 山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エボキシ化合物によるプリオン不活化 第 131 回日本獣医学会学術集会 (東京) 2001 年 4 月
- ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊 PrP 遺伝子 Tg マウスの羊スクレイビープリオンに対する感受性 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2001 年 11 月
- 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製 PrP^{Sc} 画分と特異的に反応する mAb 6H10 の解析 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2001 年 11 月
- 金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体パネルの作製 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2001 年 11 月
- 毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋白質検出法の開発 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2001 年 11 月

牛海綿状脳症確定検査プロトコール

1. 試薬等

コラゲナーゼ (細胞分散用)	和光	100 mg, No. 038-10531
Pefablock	Roche	500 mg, No. 1585916
Proteinase K	Roche	100 mg, No. 745723
N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma	100g, No. L-5125
Zwittergent 3-14	Calbiochem	5 g, No. 693017
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma	500 g, No. L-4509
2-mercaptoethanol	Sigma	100 ml, M-6250
Urea	和光	500 g, 217-00615
2-Butanol	和光	500 ml, 020-11215
Tween 20	和光	500 ml, 167-11515
スキムミルク	COOP、明治、雪印など	
Immobilon-PVDF	Millipore	No. IPVH00010
X線フィル (RX-U)	富士フィルム	六切, No. 03D051
ECL ウェスタンブロットリング検出試薬	Amersham Pharmacia	No. RPN2209
Anti-rabbit IgG HRP 標識	Amersham Pharmacia	1ml, NA 9340
Anti-mouse IgG HRP 標識	Amersham Pharmacia	1ml, NA 9310
O-リング付き 2ml チューブ	アシスト	No. 72.693S
丸底 2ml チューブ	アシスト	No. 72.695S

2. 試薬の調整

- TN buffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Detergent buffer: 4% Zwittergent 3-14, 1% Sarkosyl, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Butanol-Methanol solution: 2-Butanol:Methanol = 5:1
- Proteinase K: 1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM CaCl₂, aliquoted, stored at -20°C.
- Pefablock: 0.1 M in DDW, aliquoted, stored at -20°C.
- Collagenase: 20 mg/ml in DDW, aliquoted, stored at -20°C.
- Sample buffer (x1): 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% glycerol, 3 mM EDTA, 5% SDS, 4 M Urea, 4% β-mercapthoethanol, 0.04% bromo phenol blue. 使用中の少量は室温保存可能。長期間の保存は 4°C (Urea, SDS が析出するが使用時に 50°C程度に加温溶解可) が望ましい。

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
Glycerol	1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	120 ul
β -Mercapthoethanol	800 ul
1% bromo phenol blue	400 ul
SDS	1 g
Urea	4.8 g
<hr/>	
	Up to 20ml

3. 脳乳剤の調整 (キアゲン社のミキサーミルを使用した場合)

- 1) 200 mg の脳組織をアシスト 2 ml 丸底チューブに採材。
- 2) 800 ul の TN buffer とタングステンビーズを一粒加える。
- 3) ミキサーミルで 20Hz, 45sec 振盪。
- 4) これを 20%(W/W)脳乳剤とし、O-リング付きチューブに保存する。

脳乳剤の調整はバイオハザード対策の観点からすると、安井機器のマルチビーズショッカーを使用したほうが良いかもしれない。

4. 試料調整

- 1) 20%(W/W)脳乳剤 250 ul に Detergent buffer 250 ul を加え Vortex および超音波処理。
O-リング付き 2ml チューブを使用する
- 2) 12.5 ul の 20 mg/ml collagenase を加え Vortex.
- 3) 37°C、30 分間消化 (必ずウォーターバス中で行う)。
- 4) 20 ul の 1 mg/ml PK を加え Vortex。
- 5) 37°C、30 分間消化 (必ずウォーターバス中で行う)。
- 6) 10 ul の Pefablock を加え Vortex.
- 7) 250 ul の Butanol-Methanol solution を加え Vortex.
- 8) 15,000 rpm, 10 min, 20°C遠心。
- 9) 沈殿を軽く乾燥させる。
- 10) 100 ul の 1x Sample buffer を加えて 100°C、5 min ボイルする。沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行う。(試料調整が上手く行われていれば、50 ul の Sample buffer にも溶解できます)。

5. SDS-PAGE

Invitrogen 社 (旧 Novex 社) のプレキャストゲルを使用する。

- ・Gel: NuPAGE 12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 12 well (Invitrogen No. NP0342)
- ・ゲルローディングチップ (Invitrogen No. LC1001) を使用して 20 ul (10 mg 組織等量) を load する。
- ・Buffer: NuPAGE MOPS SDS Running buffer (Invitrogen No. NP0001)。陰極側のバッファには instruction に指示された量の Antioxidant (Invitrogen No. NP0005) を加える。
- ・泳動条件は instruction に従う (200V、定電圧)。

Positive control は感染マウス脳由来サンプル (100 ug/10ul 組織等量) を原液 (4^0) とし、 4^{-1} (25 ug/10 ul), 4^{-2} (6.25 ug/10 ul), 4^{-3} (1.6 ug/10 ul) の 4 階段希釈列を作製し、 $4^0 \sim 4^{-3}$ のコントロールを 10 ul/lane ロードする、等の措置をとっておくことにより、WB の感度を評価することが可能となる。

6. ウェスタンブロット

- ・ウェットタイプブロッキング装置を使用すること。白金線電極のものを使用する (例: バイオラッド、ミニトランスブロットセル、170-3930 ; IWAKI、マイクロスラブゲル用ブロッキング装置、KS-8451)
- ・トランスファーバッファ: Invitrogen 社の instruction に指示されたトランスファーバッファ (NuPAGE transfer buffer (Invitrogen No. NP0006)、antioxidant (Invitrogen No. NP0005)、メタノール) に SDS を 0.01% になるよう加えたもの。
- ・PVDF 膜 (Immobilon-PVDF) はメタノールに 1 分間浸し活性化する。その後、DDW で洗い、トランスファーバッファに浸しておく。
- ・電気泳動が終了したゲルをトランスファーバッファに浸す。
- ・トランスファーバッファで濡らした濾紙 (2 枚) の上に PVDF 膜を置く。その上にゲルを置く。この時ゲルと PVDF 膜の間に気泡が入らないよう注意する。ゲルの上にトランスファーバッファで濡らした濾紙 (2 枚) を重ねる。
- ・上記の濾紙-PVDF-ゲル-濾紙のサンドウィッチをブロッキングパッドではさみ、ブロッキング装置にセットする。蛋白質は陰極から陽極へと移動するのでゲルの陽極側に PVDF 膜が位置するようセットすること。
- ・a) または b) の条件でブロッキングを行う。
 - a) 40V 定電圧 4 時間~15 時間。
 - b) 80~100V 定電圧 1~2 時間。