

## 7. 免疫染色

- 1) ブロッキング：5% skim milk in PBST (0.1% Tween 20)。Skim milk は必ず加温溶解 (80°C 程度) すること。
- 2) メンブレンローラー (Advantec, No. EBA-200) 上で1時間。
- 3) 一次抗体：1% skim milk in PBST で希釈。Affinity purified B-103 は1:5000、B-103 ウサギ血清は1:1000~1:2000 で使用すること。
- 4) メンブレンローラー上で1時間。
- 5) PBST で20分間洗浄。5回PBST交換
- 6) 二次抗体(Amersham NA9340)：1% skim milk in PBST で1:2500希釈。
- 7) メンブレンローラー上で45分。
- 8) PBST で20分間洗浄。5回PBST交換
- 9) ECL ウェスタンブロットティング検出試薬で発光
- 10) X線フィルムに2分間露光し、現像
- 11) 現像している間に、次のX線フィルムを露光させる。
- 12) 30分後に現像 (つまり、2分、および30分露光の x-ray film を作製する)。
- 13) その後必要に応じてオーバーナイトで露光させる。

現像液：ハイレンドール

停止液：3%酢酸

定着液：スーパー富士フィックス

### 実施例 1

DAY 1: 試料調整 (1.5 時間)

DAY 2: SDS-PAGE (1.5 時間) → WB (2 時間) → 免疫染色 (4 時間)

### 実施例 2

DAY 1: 試料調整 (1.5 時間) → SDS-PAGE (1.5 時間) → WB (最大 15 時間)

DAY 2: 免疫染色 (4 時間)

### 実施例 3

DAY 1: 試料調整 (1.5 時間) → SDS-PAGE (1.5 時間) → WB (1 時間) → 免疫染色 (4 時間)

Bio-Rad 社の BSE purification kit にて作製された 20% brain homogenate を用いて確認検査用 WB を行う場合。

- 1) 20% brain homogenate 250 ul に detergent buffer 250 ul を加え Vortex および超音波

処理。

- 2) 12.5 ul の 20 mg/ml collagenase を加え Vortex.
- 3) 37°C、30 分間消化
- 4) 20 ul の 1 mg/ml PK を加え Vortex。
- 5) 37°C、30 分間消化。
- 6) 10 ul の Pefablock を加え Vortex。
- 7) Kit に含まれている Clarifying solution を 250 ul 加える。
- 8) Methanol 150 ul を加える。  
7), 8) の処理は 250 ul の Butanol-Methanol solution を加えることで置き換えられるが、沈殿の量が多くなる傾向がある。
- 9) Vortex。
- 10) 15000 rpm, 10 min, 20°C 遠心。
- 11) 沈殿を乾燥させる。
- 12) 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、超音波処理を行い溶解する。

表 1 確定検査用ウエスタンブロット法

項目	操作など	時間	積算時間
脳乳剤調製	マルチビーズショッカー, 2000 rpm, 15 sec	20 min	
前処理	Collagenase, 0.5 mg/100mg tissue 37°C	30 min	50 min
PK 処理	Proteinase K, 40ug/100 mg tissue, 37°C	30 min	80 min
PK 不活化	2 mM Pefabloc	5 min	
脂質除去	2-butanol : methanol = 5 : 1	5 min	90 min
PrP <sup>BSE</sup> 回収	15000 rpm	10 min	
WB 用	SDS-Urea sample buffer	20 min	120 min
SDS-PAGE	Invitorgen, NuPAGE 12% Bis-Tris gel, 200V	60 min	180 min
転写	Wet blotting, 80V	60 min	240 min
ブロッキング	5% skim milk - (5% FBS) in PBST	60 min	300 min
一次抗体	B-103	60 min	360 min
洗浄	PBST	20 min	380 min
2次抗体	HRP 標識抗ウサギ IgG	60 min	440 min
洗浄	PBST	20 min	460 min
化学発光	ECL	30 min	490 min

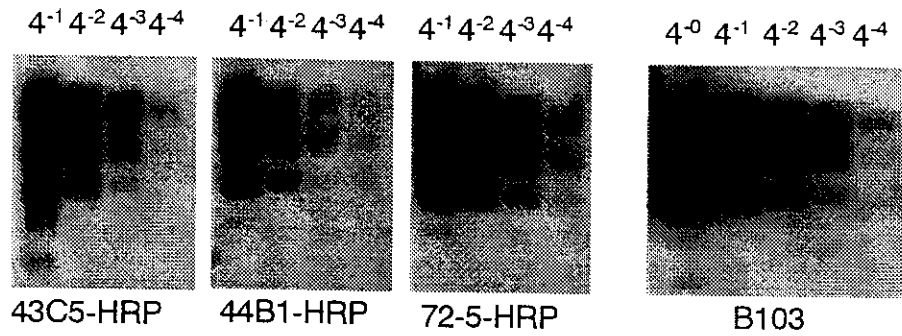


図1. 間接法と直接法によるPrP<sup>Sc</sup>検出感度の比較。

43C5-HRP, 44B1-HRP, 72-5-HRPはHRP標識Fabフラグメントを用いた直接法で検出した。B103は2次抗体にHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いた間接法で検出した。抗原としてBSE確定検査に使用しているマウスPrP<sup>Sc</sup>(lot011209)を段階希釈して電気泳動したものを用いた。4<sup>-0</sup>, 100 ug brain/lane; 4<sup>-1</sup>, 25 ug brain/lane; 4<sup>-2</sup>, 6.3 ug brain/lane; 4<sup>-3</sup>, 1.6 ug brain/lane; 4<sup>-4</sup>, 0.4 ug brain/lane。

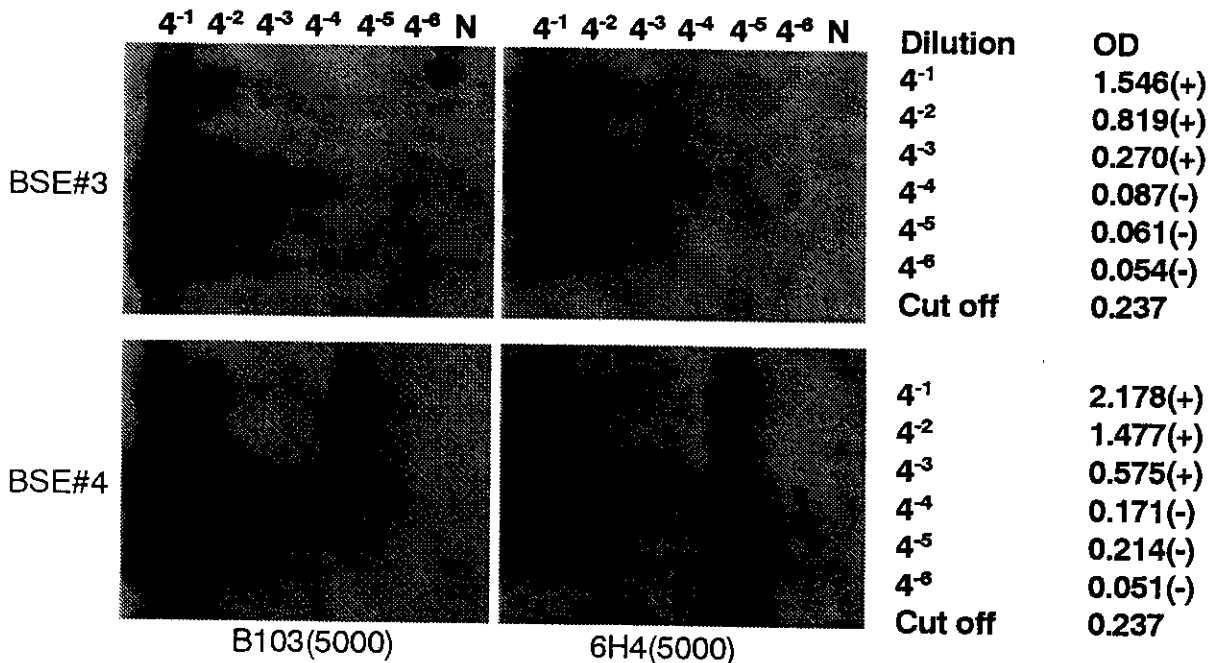


図2. スパイクテスト。BSE#3およびBSE#4の20%脳乳剤をBSE非感染牛の20%脳乳剤で4倍改段階希釈した乳剤からWB用試料を調整した。各レーン10mg組織当量を泳動。B103と6H4で染色した(カッコ内は希釈倍率)。NはBSE非感染牛のサンプル(陰性対照)。30分間露光した。6H4, B103ともに4<sup>-4</sup>希釈(256倍)まで陽性であった。

同じ希釈列を用いて行ったBio-RadELISAの結果を写真右に示した。BSE#3およびBSE#4ともに4<sup>-3</sup>希釈(64倍)まで陽性であった。

# 免疫組織化学による BSE 感染牛の検査

研究者 古岡 秀文

帯広畜産大学畜産学部家畜病理学教室

## 研究要旨

BSE のスクリーニング検査陽性牛の確定診断のための免疫組織化学的迅速診断法の開発を行った。この検査法での精度の確認、迅速性と簡便性についても検討を行い、その有効性を確認した。また、この開発した免疫組織化学的迅速診断法を用いて、実際に確定診断を行い、2頭の BSE 陽性牛の確定診断を行った。

## A. 研究目的

昨年 9 月に国産牛での BSE の発生が報告されたこと、過去に EU からの肉骨粉の輸入があったこと、さらに羊スクレピーが散発していることから昨年 10 月より食肉衛生検査所と畜解体された牛全頭に対してスクリーニング検査が行われている。このスクリーニング検査で陽性とされた牛の確定診断のための免疫組織化学的迅速診断法の開発と陽性牛に対する検査を実際に行うとともに、一部は技術移転を行った。

## B. 研究方法

1) 免疫組織化学的迅速診断法の開発：スクレピー感染マウス脳組織を用いて、組織の固定条件の検討、実験者の安全のために行う蟻酸による組織内でのプリオン蛋白の不活化後の免疫染色の精度について検討を行った。また、精度の上昇のために様々な後処理の方法を検討するとともに、迅速診断法のための条件設定を行った。また、将来的な自治体レベルでの検査に対応できるように、その簡便性についても検討した。

2) 上記迅速診断法に基づき、スクリーニング検査陽性牛について、確定検査を行った。

## C. 研究結果

免疫組織化学的迅速診断法の開発では通常の病理検査では一週間近くを要する免疫染色法を固定、包埋から染色結果を得るまでに、およそ 8 時間程度で実施することが可能となった。また、検査実施者の安全性の確保のために行われる組織におけるプリオン蛋白の不活化のための蟻酸処理は免疫染色の感度の低下をもたらす。これに関しては北本らの方法に準じて、希塩酸内でオートクレーブ処理を行うことで免疫染色法の感度の維持、上昇を得ることができるようになった。これら染色法のプロトコールの一部は国立感染症研究所で改良し、自治体の一部の研究機関に技術移転を行った。この方法については図 1 として添付した。

また、開発した免疫組織化学的迅速診断法により、実際の確定検査を実施した。病理組織学的には診断が不可能であった 2 例の BSE 陽性牛を免疫組織化学的に確定診断した。

## D. 考察

今回開発した BSE のための免疫染色迅速診断法により、時間的な短縮が可能となるばかりでなく、自動化、市販のキットを取り入れることで、安定した結果を得ることができるようになった。また、比較的簡便な方法であることから、技術移転が比較的容易に行うことができるようになったと考えられる。スクリーニング検査で陽性牛が摘発された時点で、該牛は出荷停止となり、自治体によってはと畜検査そのものが停止する。そのため、確定診断の精度と迅速性を備え、かつ比較的簡便である本法は今後自治体レベルで行われるようになる確定診断法として有効と考えられる。

また、臨床症状を示す BSE 牛では病理組織学的所見から確定診断が可能であるが、一般健康畜として搬入され、摘発された 2 例では組織学的診断は不可能であった。開発した免疫組織化学的迅速診断法では、これら陽性牛に対して明らかかな陽性所見が得られた。ウエスタンブロット法による確定診断を主診断法としつつも、本法による免疫組織化学的診断法との併用により、より精度の高い確定診断が期待できると考えられる。

## E. 結論

新しく開発した免疫組織化学的迅速診断法は、迅速性、精度、およびその簡便性から、ウエスタンブロット法による確定診断法との併用により、BSE の確定診断にきわめて有用性が高い。

## G. 論文発表

本研究に関しては特にない。

## 確認検査のための免疫組織化学的迅速

脱パラフィン	10分
水洗	5分
オートクレーブ処理 121℃, (1mMHClに浸漬)	20分 (所要時間1.5時間)
3%過酸化水素水滴下	5分
PBS洗浄	5分×3回
一次抗体の反応*	常温30分
PBS洗浄	5分×3回
二次抗体の反応**	常温30分
PBS洗浄	5分×3回
DABによる発色	2～5分
流水洗	5分
ヘマトキシリン染色	1分
流水洗(温湯)	5分
脱水・封入	10分

- \* 一次抗体の希釈はPBSで行う  
(×500,×1000,×2000,×4000)  
ネガティブはウサギ正常血清(×1000)
- \*\* ENVISION+ポリマー試薬(DAKO)

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

食肉の神経組織による汚染防止に関する研究  
分担研究者 沢谷 広志 神奈川県食肉衛生検査所長

研究要旨

牛の特定危険部位のひとつである脊髄の飛散が懸念されると畜・解体方法（背割り等）について、可食部への脊髄付着が防止できる方法について研究・開発を行い、併せて現行のと畜・解体方法（スタンニング及びピッシング）による食肉等への特定危険部位の汚染状況等を調査検証する。

A. 研究目的

特定危険部位である脳、脊髄等の中樞神経系組織（以後「CNS」という。）の食肉中への混入防止は、食肉の安全性を確保する上で非常に重要である。このため、と畜場法施行規則の一部が改正され、牛の頭部、脊髄、回腸遠位部といった特定危険部位についてはすべて焼却し、枝肉及び食用に供する内臓は、特定危険部位による汚染を防ぐよう処理することとなった。

この規則の実行ある実施のためには、食肉にCNSが混入していないことの確認手段が必要である。また、と畜場において食肉がCNSにより汚染されない処理方法の確立、器具等からCNSを完全に除去する洗浄手段の確立のためにも、肉、器具表面に付着したCNSを感度高く正確に検出する方法が不可欠である。

R-biopharm社は、CNSに含有されるグリア繊維細胞酸性タンパク質（以後「GFAP」という。）をサンドイッチELISA法により検出するキットを開発し、RIDASCREEN Risk Material 及びRIDASCREEN Risk Material 10/5として販売している。我が国ではそれぞれRIDAスクリーン脳・脊髄組織含有テスト（以後

「RIDAスクリーン」という。）及び脳・脊髄組織含有テスト（生肉／拭取り・定量用）（以後「拭取りテスト」という。）の商品名で、アヅマックス㈱よりすでに販売されている。RIDAスクリーンは、生肉又は加工肉中に混入しているCNSをバッファで抽出してから検出するためのキットであり、拭取りテストは食肉・器具表面から綿棒で拭き取ったCNSを検出するためのキットである。

これらのキットは、前記の食肉表面及び内部に存在するCNSを検出して食肉の安全性を確保し、さらに食肉処理法・器具洗浄法を確立する目的のために有用と考えられる。そこで、国立医薬品食品衛生研究所食品部第二室長の松田りえ子氏これら2種のキットのCNS検出性能、肉中のCNSの検出及び肉等の表面の拭き取り試験への適正について研究依頼するとともに、拭き取りテストを用いて、背割り前の脊髄除去方法の検証及びスタンニング並びにピッシングによる血液中的CNS混入の有無の検証を行い、また、脊椎骨周辺の食肉中のCNS混入について併せて調査する。

B. 研究方法

1. 検出キットの性能

協力研究者 松田りえ子 国立医薬品  
衛生研究所食品部第二室長

### 試薬

RIDA スクリーン脳・脊髄組織含有テスト  
(RIDA スクリーン)

R-biophar 社製。キット中に以下の器具・  
溶液等を含む。

・マイクロタイタープレート

8 ウェル×12 列 抗 GFAP 抗体が固  
相化されている。

・標準溶液 4 種 0、0.2、1.0、2.0%\*

・酵素複合体

抗 GFAP 抗体・ペルオキシダーズ複合  
体溶液

・抽出バッファー

用時 10 倍希釈。SDS 10%を含有するリ  
ン酸緩衝液

・試料希釈バッファー

用時 10 倍希釈。SDS 0.5%を含有する  
リン酸緩衝液

・洗浄バッファー

蒸留水 1 L に溶解する。Tween20 0.05%  
を含有するリン酸緩衝液

・気質/発色液

テトラメチルベンジジン含有

・反応停止液 1 N 硫酸

\* 標準溶液に付されている濃度表示は、  
GFAP あるいは脊髄組織の濃度ではない。

脳・脊髄組織含有テスト (生肉/拭取り・  
定量用) (拭取りテスト)

R-biophar 社製。キット中に以下の器具・  
溶液等を含む。

・マイクロタイタープレート

8 ウェル×12 列 抗 GFAP 抗体が固  
相化されている。

・標準溶液 3 種\*\* 0、0.2、1.0%

・酵素複合体

抗 GFAP 抗体・ペルオキシダーズ複合  
体溶液

・試料希釈バッファー

用時 10 倍希釈。SDS 0.5%を含有する  
リン酸緩衝液

・洗浄バッファー

蒸留水 1 L に溶解する。Tween20 0.05%  
を含有するリン酸緩衝液

・気質/発色液

テトラメチルベンジジン含有

・反応停止液 1 N 硫酸

\*\* 現在市販されている製品は、本研究実  
施時と標準溶液濃度と本数が異なってお  
り、0、0.1、0.2、0.4%が含まれている。現  
在品の 0.1%標準液と旧製品の 0.2%標準  
溶液は同一濃度である。

### 装置

マイクロストリップリーダー STAT  
FAX303 (Awareness Technology Inc.)、ホ  
モジナイザー (POLYTORON)、遠心分離  
器 (KUBOTA 8100)を使用した。

### 操作方法

CNS 拭取り試験試料溶液調整方法

綿棒をあらかじめ試料希釈バッファーで  
湿らせ、肉又はガラス表面 5×5 cm を拭  
き取る。綿棒を試料希釈バッファー 1 ml  
中に入れ、拭き取った組織をバッファーに  
懸濁させて試料溶液とする。

### 肉中の CNS 試験試料溶液調整方法

肉 2 g をねじ蓋付き遠沈管に取り、抽出  
用バッファー 10 ml を加えて、ホモジェナ  
イズする。100°C の水浴中で 15 分間加熱し  
た後、10°C に冷却する。冷却後遠心分離し、  
表面の脂肪を除去し、上清 50 μl を採取  
し、試料希釈バッファー 950 μl を加え、  
試料溶液とする。

### 拭取りテスト操作法

各ウェルに試験液又は標準溶液 50 μl



を加え、次に酵素複合体溶液 50  $\mu$  l を加えて室温で 10 分間放置する。ウェル内の液を除き、洗浄バッファーで 3 回洗浄する。基質/発色液 100  $\mu$  l を加え暗所で 5 分間放置した後、反応停止液 100  $\mu$  l を加え、10 分以内に 450 nm における吸光度を測定する。

#### RIDA スクリーン操作法

各ウェルに試験液又は標準溶液 50  $\mu$  l を加え、次に酵素複合体溶液 50  $\mu$  l を加えて室温で 30 分間放置する。ウェル内の液を除き、洗浄バッファーで 3 回洗浄する。基質/発色液 100  $\mu$  l を加え暗所で 30 分間放置した後、反応停止液 100  $\mu$  l を加え、10 分以内に 450 nm における吸光度を測定する。

### 2. 背割り前脊髄除去方法の評価について

#### 実施機関

群馬県北部食肉衛生検査所、埼玉県中央食肉衛生検査センター、千葉県東総食肉衛生検査所、横浜市食肉衛生検査所、大阪府松原食肉衛生検査所、鹿児島県末吉食肉衛生検査所及び神奈川県食肉衛生検査所

#### 調査対象

連続して解体処理された牛 5 頭についての調査を 4 回、計 20 頭の牛を対象にとたいからの脊髄除去率及び枝肉等への脊髄汚染度を調査する。

#### 実施方法

##### ・とたいからの脊髄除去率

吸引法又は押出法により除去された脊髄の重量を秤で測定したものを A (g) とし、吸引法又は押出法により除去しきれなかった脊髄を背割り後除去し、その重量を秤で測定し A 値を加えたものを B (g) とする。

これらの値から、とたいからの脊髄除去率 ( $100 \times A / B$  (%)) を算出する。

##### ・枝肉等への脊髄汚染度

枝肉等について以下に示す部位の拭取りを実施し、アジマックス(株)から市販されている「RIDA スクリーン脳・脊髄組織含有テスト (生肉/拭取り・定量用)」のマニュアルに従って、脊髄汚染の有無を調査する。

##### <枝肉等の拭取り部位>

- ① 第三頸椎 (切断面) を中心とした 10  $\times$  10cm の正方形部分
- ② 最後胸椎 (切断面) を中心とした 10  $\times$  10cm の正方形部分
- ③ 胸部外側の 10  $\times$  10cm の正方形部分
- ④ 腰部外側の 10  $\times$  10cm の正方形部分  
(以上の 4 部位は、それぞれ左右について行う。)
- ⑤ 背割鋸の刃両面

### 3. スタンニング及びピッシングの影響による血液中の CNS について

#### 実施機関

神奈川県食肉衛生検査所

#### 調査対象

- ・平塚市食肉センター (スタンニング後ピッシングの代替法として脊髄切断を実施している。) でとさつ解体される牛 20 頭。
- ・厚木食肉センター (スタンニング後ピッシングを実施している。) でとさつ解体される牛 20 頭。

#### 実施方法

##### ・血液採材

牛の生体検査時の生前血、脊髄切断後 (平塚) 又はピッシング後 (厚木) の放血、右心房・室の心残血をプレーン及びヘパリン加の小試験管に採取する。

##### ・材料調整

プレーン小試験管に採取した血液は、2,200 g で 15 分間遠心分離後、血清を希釈バッファーで 20 倍に希釈する（血清 50  $\mu$  l : 希釈バッファー 950  $\mu$  l）。

ヘパリン加小試験管で採取した血液は、一部を希釈バッファーで 20 倍に希釈した後（血液 50  $\mu$  l : 希釈バッファー 950  $\mu$  l）、1,750 g で 15 分間遠心分離後、血漿を希釈バッファーで 20 倍に希釈する（血漿 50  $\mu$  l : 希釈バッファー 950  $\mu$  l）。

#### ・ELISA

RIDA スクリーン脳・脊髄組織含有テスト（生肉／拭取り・定量用）を使用し、次の手順で実施する。

- ①抽出試料、各標準液を 50  $\mu$  l ずつ各ウェルに滴下する。
- ②各ウェルに酵素複合体液を 50  $\mu$  l ずつ滴下し、振とうする。
- ③室温で 30 分間インキュベート後、ウェル内の液を除去し、洗浄バッファー 300  $\mu$  l で 5 回洗浄する。
- ④各ウェルに基質／発色液を 100  $\mu$  l ずつ滴下し、振とうする。
- ⑤暗箱内にて室温で 5 分間インキュベート後、各ウェルに反応停止液を 100  $\mu$  l ずつ滴下し、450nm の波長で吸光度を測定する。

#### 4. くず肉（脊椎付着肉）中の CNS について

##### 実施機関

神奈川県食肉衛生検査所

##### 調査対象

平塚市食肉センター又は厚木食肉センターでとさつ解体された牛 17 頭。

##### 実施方法

##### ・試験材料

牛枝肉の椎骨外側部（胸部：第 5 頸椎～

第 3 胸椎（脊髄頸膨大部）、腰部：第 1、2 腰椎（脊髄腰膨大部））の 2 箇所各 50 g を材料とする。

##### ・材料調整

細切した材料 2 g に希釈バッファー 10ml を加え、ホモジェナイズ後、100℃で 15 分間加熱する。10℃で冷却後、3,500 g で 10 分間遠心する。脂肪層を取り除き、上清を希釈バッファーで 20 倍に希釈する（上清 50  $\mu$  l : 希釈バッファー 950  $\mu$  l）。

・ELISA  
RIDA スクリーン脳・脊髄組織含有テスト（生肉／拭取り・定量用）を使用し、次の手順で実施する。

- ①抽出試料、各標準液を 50  $\mu$  l ずつ各ウェルに滴下する。
- ②各ウェルに酵素複合体液を 50  $\mu$  l ずつ滴下し、振とうする。
- ③室温で 30 分間インキュベート後、ウェル内の液を除去し、洗浄バッファー 300  $\mu$  l で 5 回洗浄する。
- ④各ウェルに基質／発色液を 100  $\mu$  l ずつ滴下し、振とうする。
- ⑤暗箱内にて室温で 5 分間インキュベート後、各ウェルに反応停止液を 100  $\mu$  l ずつ滴下し、450nm の波長で吸光度を測定する。

#### C. 研究結果

##### 1. 検出キットの性能

##### GFAP の検出範囲

GFAP 標準品（PROGEN 社製）を希釈して 100、50、20、10、5、2.5、1 ng/ml 溶液を調製し、拭取りテストの測定可能範囲を検討した。0%標準溶液から得られた吸光度をブランクとし、各濃度で得られた吸光度からブランクをさし引いた値を測定値とした。

GFAP 濃度と測定値から得られた検量線を Figure 1 に示す。その結果、GFAP 2.5～10 ng/ml の範囲で直線性が認められた（相

関係数 0.9981)。これは各ウェル当たり、GFAP0.125~0.5 ng に相当する。

10 ng/ml 以上では直線性は失われるが、100 ng/ml までは吸光度が濃度に伴って上昇するため、半定量は可能であった。また、5 ng/ml 以上で、目視により陰性コントロールと明瞭に判別が可能であった。

得られた検量線から 0.2 % 標準溶液の GFAP 濃度を求めたところ、10.4 ng/ml であった。

#### 脊髄組織の検出範囲

牛脊髄 500mg に蒸留水 20ml を加えてホモジェナイズし、これを段階的に希釈して、100、50、20、10  $\mu$ g/ml の脊髄組織懸濁液を調製した。脊髄の 2 箇所から採取した原液から 2 種類の懸濁液を調製した。

拭取りテストを用いて、各濃度で 2 回ずつの測定を行った。同時にブランクとして 0 % 標準溶液と、ポジティブコントロールとして 0.2% 標準溶液を測定した。結果を Table 1 に示す。

採取部位による差は観測されなかった。また、10  $\mu$ g/ml (ウェル当たり脊髄 0.5  $\mu$ g) の濃度では、コントロールとした 0.2% 標準溶液よりも高い吸光度が得られた。直線性を仮定すれば、2  $\mu$ g/ml (ウェル当たり脊髄 0.1  $\mu$ g) でもブランクより 0.1 高い吸光度が得られ、測定が可能である。

100  $\mu$ g/ml では吸光度が 3 以上となり測定不能であった。

#### ガラス表面からの拭取り試験

器具表面からの CNS 拭取り試験への、拭取りテストの適用性を検討した。前項と同様の方法で、1000、500、250、100  $\mu$ g/ml の脊髄懸濁液を調製し、ガラス板表面 (5  $\times$  5 cm) に 100  $\mu$  1 滴下し、1 時間室温で乾燥させた。ガラス板への滴下量は、それぞれ脊髄組織 100、50、25、10  $\mu$ g となる。

希釈バッファーで湿らせた綿棒でガラス表面を拭き取り、希釈バッファー 1 ml 中に拭き取った組織を懸濁させて試料溶液とした。完全に脊髄組織が拭き取れば、試料中の脊髄組織濃度は、100、50、25、10  $\mu$ g/ml となる。拭き取りは 2 回ずつ行い、各試料を 2 回測定した。同時にブランクとして 0 % 標準溶液と、ポジティブコントロールとして 0.2% 標準溶液を測定した。結果を Table 2 に示す。

拭取り及び希釈バッファーへの回収はばらつきが大きく、2 回の拭取りの結果の差がかなり大きい場合があった。50  $\mu$ g 以上の滴下量では、0.2% 標準溶液よりも高い吸光度が得られ、目視でも検出可能であった。25  $\mu$ g では目視では判定できないが、吸光度測定によればブランクとの区別が可能であった。また、バッファーのみを滴下して測定した場合、ブランクと同程度の吸光度となった。これより、この方法によりガラス・金属等の表面に付着した脊髄組織が高感度に検出できることが示された。

10  $\mu$ g の滴下量ではブランクと同程度の吸光度となり、検出できなかった。脊髄を直接測定した場合には、10  $\mu$ g/ml の溶液が十分に検出可能であり、25 及び 50  $\mu$ g の滴下量の測定値が、対応する脊髄量を直接測定した時の測定値の 1/2 以下であることから、拭取りにより定量的に脊髄組織が回収されていないと考えられる。さらに、滴下量と測定値間に直線性がみられないことから、この方法による精密な定量は困難であり、検出法あるいは半定量法と位置づけられる。

拭取り操作及び組織のバッファーへの懸濁に伴うばらつきが大きいことから、実際の拭取り試験においては、数箇所を拭き取って平均値を求めることが望ましい。

#### 牛肉表面からの拭取り試験

前項と同様の試験を肉表面でも行った。ただし、滴下する液量を  $20\mu\text{l}$  とし、脊髓組織の量は  $20$  及び  $40\mu\text{g}$  とした。結果を Table 3 に示す。希釈バッファ- $20\mu\text{l}$  を滴下して同様に試験した時の吸光度は、ブランクと同程度で、偽陽性は出現しにくいと考えられる。脊髓  $40\mu\text{g}$  の滴下量で  $0.2\%$  標準溶液と同程度の吸光度となった。 $20\mu\text{g}$  の滴下でもブランクよりも  $0.1$  高い吸光度となり、ガラス板の場合とほぼ同程度の検出能が得られた。

ガラス板よりも表面が平滑でないことや、肉組織へ液が浸透する等により、綿棒への回収率にばらつきがあることが予想される。実際に、前項のガラス表面からの拭取りよりも再現性が悪い傾向がみられた。したがって、ガラス・金属表面の試験と同様に、数箇所を拭き取って平均値を求めることが望ましい。

#### 牛肉への添加試験

拭取りテストに指定された方法に従い、綿棒での採取による、牛肉中の脊髓組織検出を検討した。牛挽肉  $10\text{g}$  に脊髓懸濁液を添加し十分に攪拌した後試料とした。ここに希釈バッファ-で湿らせた綿棒を差し込み、その後希釈バッファ-  $1\text{ml}$  に採取物を懸濁して試料溶液とした。

脊髓組織を  $1\%$  添加し、3回の繰り返しを行った。 $0.2\%$  標準溶液以上の吸光度が得られ、十分検出可能であったが、その再現性は表面の拭取り試験以上に悪く、RSD $30\%$ 程度となった。次いで、添加量を  $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.5\%$  とした結果、 $0.2\%$  付近でほぼ  $0.2\%$  標準溶液と同程度の値となった。無添加の肉から採取した場合は、ブランクと同程度の値となり、特に妨害は認められなかった。

牛挽肉  $10\text{g}$  に脊髓懸濁液を添加し試料とした。添加量は  $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1\%$  とした。

これに蒸留水  $50\text{ml}$  を加えてホモジェナイズし、 $3,000\text{rpm}$  で  $10$  分間遠心分離し、上清  $1\text{ml}$  をとり  $20$  倍に希釈したものを試料溶液とした。試料溶液中の脊髓濃度はそれぞれ、 $10$ 、 $50$ 、 $100\mu\text{g/ml}$  となる。脊髓組織に検出範囲の結果より、この濃度は十分検出可能であるが、実際には  $0\%$  標準溶液と同程度の吸光度しか得られず、検出できなかった。この原因は抽出が不十分であるというよりは、同時に抽出された肉成分の妨害である可能性が高い。

上記の結果から、肉中に混入した CNS を拭取りテストを用いて検出することは、実用的ではないと考えられる。

#### 拭取りテストによる試験の再現性

以上の各項の検討時に行った、 $0.2\%$  標準溶液についての結果から、再現性を評価した。 $0.2\%$  標準溶液の測定を併行して2回ずつ行った日が7日あったので、このデータから、併行再現性と日間再現性を評価した。Figure 2 には各試験での  $0.2\%$  標準溶液の吸光度を示す。このデータから計算した併行再現性の RSD は  $3.1\%$ 、日間再現性の RSD は  $13\%$  であった。

#### RIDA スクリーンの定量範囲

RIDA スクリーンについても、脊髓組織の検出範囲の検討を行った。脊髓  $1\text{g}$  を試料抽出バッファ- $100\text{ml}$  に懸濁し、この懸濁液を試料抽出バッファ-で順次希釈し、 $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $50\mu\text{g/ml}$  を調製した。これらの液を使って、RIDA スクリーンの測定可能範囲を検討した。同一試料溶液を併行して2回測定した。結果を Table 4 及び Figure 3 に示す。

脊髓濃度と測定値はほぼ直線的な関係を示したが、高濃度でやや直線からのずれがみられた。脊髓  $5\mu\text{g/ml}$  の懸濁液（ウェル中脊髓  $0.25\mu\text{g}$ ）で  $1$  以上の吸光度が得

られ、目視によってもブランクと明瞭に区別が可能であった。脊髄 0.5  $\mu\text{g/ml}$  では(ウエル中脊髄 0.025  $\mu\text{g}$ )、目視ではブランクと区別が困難であったが、吸光度はぶらんくよりも 0.1 程度大きく、十分に検出可能であった。

拭取りテストと比較すると、同じ脊髄組織量で得られる吸光度はかなり高い。免疫反応、発色反応共に、長時間反応させているためと考えられる。

#### RIDA スクリーンの再現性

0.2%標準溶液を2回ずつ4回測定した結果から、測定の併行及び日間再現性を求めた。併行再現性は 2.8%RSD、日間再現性は 21.0%であった。拭取りテストと比較すると、併行再現性は同程度であったが、日間再現性は 1.5 倍程度大きかった。これは、非常に気温の高い日の吸光度が他の日の 1.6 倍程度になったことが原因である。このことから、インキュベータ等を使用して温度管理すれば、日間再現性は改善されると思う。

#### 肉中脊髄組織の検出

肉 2 g に脊髄懸濁液を、0、0.02、0.05、0.1%となるように添加し、試料溶液調整方法にしたがって操作し、試料溶液を作製した。最終的な試料溶液の濃度は、脊髄として0、2、5、10  $\mu\text{g/ml}$  となる。結果を Table 5 及び Figure 4 に示す。

1 回目は0、0.05、0.1%について、2 回目は 0.02、0.05%で行った。肉に抽出用バッファーのみを加えた場合(0%添加)は、ブランクとほぼ同じ吸光度となった。0.02%の添加では、ブランクよりも 0.1 高い吸光度が得られ、0.2%標準溶液とほぼ同程度であった。

肉中に添加した場合、対応する脊髄と比較して吸光度が 50%程度低下した。これ

の原因として、加熱・冷却等の操作による GFAP の変性、肉成分による妨害等の理由が考えられる。そこで、脊髄懸濁液のみを 100°C で加熱して測定し、加熱・冷却の影響を検討した。結果を Figure 5 に示す。60 分まで加熱しても、吸光度の低下は 15%程度であった。したがって、肉中の脊髄検出における吸光度の低下は、脂肪・タンパク質のような肉成分による妨害の可能性が高い。脂肪等の量は試料毎に異なるため、妨害の程度も異なる可能性がある。異なる試料を用いた、第1回と第2回の 0.05%添加の吸光度もかなり変動している。

各添加量での併行再現性は、0.02%で 9.5%RSD、0.05%で 3.2%RSD と 8.5%RSD、0.1%で 10.7%RSD で、かなり大きかった。また、0.05%添加の2回の試行では、吸光度の差が 0.1 程度あった。ばらつきの原因として、試料調製過程における加熱・冷却による誤差、試料毎の脂肪・タンパク質による妨害の程度の変動、測定時の温度の変動等が考えられる。さらに、実試料の測定ではサンプリング部位による CNS 濃度の変動が考えられる。

測定時の温度等の影響は、恒温で反応させる、標準溶液と比較する等の方法で小さくすることが可能である。サンプリングについては、100 g 以上の試料を採取してよく混和し、代表的な試料を取る、1 試料当たり何回かサンプリングして平均値を求める方法により、低く抑えることができる。肉の成分による妨害の変動を抑えるためには、加熱時間を一定とする、冷却・遠心分離を確実にし、試料溶液に混入する脂肪等の量を低く抑えることが考えられる。

#### 2. 背割り前脊髄除去方法の評価 とたいからの脊髄除去率

とたいからの脊髄除去率を Table 6 に示す。千葉県吸引式の除去率が低い、これ

は脊髄除去後に硬膜を機会に除去しており、その際削られた椎骨が全体の脊髄重量に含まれたことによる。また、横浜市吸引式の除去率が高いが、これは他の施設が硬膜を含めた除去率を算定しており、横浜市が硬膜を全体の脊髄重量に含めていないためである。

#### 枝肉等の脊髄組織拭取調査結果

枝肉等の脊髄組織拭取調査結果を Table 7 に示す。また各機関の調査結果を Table 8 (群馬吸引式)、9 (埼玉吸引式)、10 (千葉吸引式)、11 (千葉押出式)、12 (横浜吸引式)、13 (大阪押出式)、14 (鹿児島吸引式)、15 (神奈川洗浄前)、16 (神奈川洗浄後) に示す。定量下限値 (スタンダード2) を超えたのは、群馬吸引式が4部位、埼玉吸引式が5部位、千葉吸引式が1部位、千葉押出式が2部位、大阪押出式が7部位、鹿児島吸引式が5部位であり、背割り前に脊髄除去をしない神奈川洗浄前では、5部位であった。また、大阪押出式を除いて、枝肉の外側 (胸部及び腰部) は定量下限値未満であった。

調査実施者が異なることから、各施設間の比較は難しいが、次の点では評価できる。大阪押出式では吸光度の高い部位が多いが、同じ押出式を採用している千葉押出式では吸光度の高い部位が少ないことから、一概に押出式が吸引式より劣るとはいえないが、少なくとも圧力や先端器具の形状、取扱い手技等に十分配慮する必要がある。また、横浜吸引式及び千葉吸引式については、ほとんどの部位で吸光度が定量下限値未満であり、吸引式に優れた特性があることを示唆している。ただし、この場合硬膜はほとんど吸引されず、背割り後に硬膜を除去する必要がある。

枝肉外側表面 (胸部及び腰部) においては、ほとんどの施設で吸光度が定量下限値

未満であったが、大阪押出式のみ、腰部特に右側の吸光度が高かった。大阪押出式では、皮が枝肉に付いている時点で脊髄除去を実施しており、ライン配置又は脊髄除去のタイミング等の影響が考えられる。

神奈川洗浄前と洗浄後の吸光度を比較すると、枝肉を十分洗浄することが、脊髄組織の枝肉汚染に対して有効な対抗手段であることがわかる。

### 3. スタンニング及びピッシングの影響による血液中のCNSについて

#### プレーン小試験管による調査結果

平塚市食肉センター (ピッシング未実施) 及び厚木食肉センター (ピッシング実施) における生全血、放血、心残血の吸光度を Table17 及び Table18 に示す。

平塚ではすべて定量下限値未満であったが、厚木で定量下限値を超えるものが5頭あった。そのうち2頭 (No. 9、20) は生前血、放血、心残血とも高く、なおかつ生前血がもっとも高いことから、採血の際のCNSのコンタミネーション、ELISAにおける非特異的反応の影響等が原因として考えられる。また別の2頭 (No.17、18) は放血の吸光度が高いことから、スタンニング及びピッシングによる外部からのCNSの2次汚染の可能性が考えられる。1頭 (No.19) については、生前血よりも心残血の吸光度が高くなっており、CNSの血液中への混入も考えられるが、20頭中1頭では断定するには早計と思われる。

#### ヘパリン加小試験管による調査結果

全血を試料としたものについての各施設の結果を Table19 及び Table20 に示す。生前血、放血、心残血すべて定量下限値未満であった。ただし、血清及び血漿で高い吸光度を示した個体の吸光度が低いことから、血球成分が ELISE の阻害物質として

作用している可能性が示唆された。

血漿を試料としたものについての各施設の結果を Table21 及び Table22 に示す。平塚ではすべて定量下限値未満であったが、厚木で3頭 (No. 9、17、20) が高い吸光度を示した。しかし、生前血がもっとも高いことから、血清の場合と同様、CNSの外部からのコンタミネーション又はELISAの非特異的反応の影響等が原因と考えられる。

#### 4. くず肉 (脊椎付着肉) 中のCNSについて

17頭の牛枝肉の椎骨外側部のくず肉中のCNSの有無について調べた結果をTable23及びTable24に示す。

100℃加熱遠心後の上清を材料としたものでは、すべてにおいて定量下限値未満であったが、細切した材料に希釈バッファーで湿らした綿棒を差し込んだものでは1頭 (No. 2) 高い値を示した。これは、腰部のくず肉は非常に脂肪が多い部位であることから、脂肪と共に肉がウェル壁に付着し、肉中のペルオキシデースがキットの基質/発色液と反応した、腰部の脊髄から座骨神経等の太い神経が分枝しており、たまたまその神経が含まれていた、等の可能性が考えられる。

なお、松田の報告では、肉中の脊髄検出において、実際の含有量よりも低い吸光度を示す傾向があり、脂肪・筋肉の混入による妨害が考えられるとあることから、肉の混入により吸光度が高くなる可能性は少ないのかもしれない。

### D. 結論

#### 1. 検出キットの性能

拭取りテストの脳・脊髄組織検出性能を評価したところ、以下の点が明らかとなった。

・GFAP標準品により検量線を作成したところ、2.5～10ng/ml又はウェル当たり0.125～0.5ngの範囲で、良好な直線性を示した。10ng/ml以上では直線性は失われるが、100ng/mlまでは吸光度が濃度に伴って上昇した。

・0.2%標準溶液はGFAP10.4ng/mlに相当した。

・ウェル当たり脊髄0.5 $\mu$ gで0.2%標準溶液以上の吸光度が得られた。目視により、陰性と判別可能な脊髄量は0.2～0.3 $\mu$ g程度と考えられる。

・ガラス表面5×5cmに脊髄組織50 $\mu$ gが存在していれば、拭取りテストにより0.2%標準溶液以上の吸光度が得られる。

・肉表面5×5cmに脊髄組織40 $\mu$ gが存在していれば、拭取りテストにより0.2%標準溶液以上の吸光度が得られる。

・綿棒を用いた拭き取りによる脊髄組織の回収は定量的ではなく、ばらつきも大きいので、数箇所を拭き取って平均値を求めることが望ましい。

・牛挽肉10gに脊髄懸濁液を添加し、綿棒で採取した場合には、脊髄0.2%添加で0.2%標準溶液と同程度の吸光度となった。しかし、このサンプリング方法の再現性はかなり低く、正確な評価のためには多数の箇所からサンプリングして平均値を求めることが必要である。

・牛挽肉10gに脊髄懸濁液を添加しホモジェナイズした上清を試料溶液として試験を行うと、ブランクと同程度の吸光度であり、検出不可能であった。肉中の成分による妨害があると考えられる。

・0.2%標準溶液の結果から、日間再現性及び併行再現性を評価したところ、それぞれRSD13%及び3.1%であった。日間再現性が大きいには、室温の変化が大きく影響することと、反応時間が短いために変動の影響も無視できないためと考

えられる。しかし、併行再現性は比較的小さく常に標準品あるいはコントロール溶液と比較すれば、測定法自体の精度はRSD 5%程度と考えられる。

RIDA スクリーンによる、肉中の脳・脊髄組織検出性能を評価したところ、以下の点が明らかとなった。

- ・脊髄懸濁液を試験したとき、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  (ウェル当たり 25ng) が検出可能であった。
- ・拭取りテストと比較すると、同一の脊髄組織量でも高い吸光度が得られ、検出感度が優れていた。
- ・0.2%標準溶液の結果から、日間再現性及び併行再現性を評価したところ、それぞれ 21% RSD 及び 2.8% RSD であった。温度コントロールを行えば、日間再現性が改善される可能性がある。
- ・肉に抽出用バッファのみを加えて試料を調製し測定すると、ブランクとほぼ同じ吸光度となった。
- ・肉中に脊髄組織を 0.02% 添加した時の吸光度は、0.2%標準溶液の吸光度とほぼ同程度であり、0.02%の脊髄組織混入が検出可能であった。
- ・肉中に脊髄組織を添加した場合、対応する量の脊髄懸濁液の結果と比較して吸光度が 50%程度低下した。加熱のみではこのような大きな低下は起こらないため、肉中の成分による妨害の可能性が高い。
- ・肉中に脊髄を添加したときの併行再現性は、0.02%で 9.5% RSD、0.05%で 3.2% RSD と 8.5% RSD、0.1%で 10.7% RSD で、かなり大きかった。

RIDA スクリーン、拭取りテスト共に、キットによる測定の併行再現性は 3% RSD 程度であった。日間再現性はこの数倍程

度であり、標準溶液と比較する必要がる。どちらのキットについても、サンプリング段階での変動はかなり大きいので、均一な試料を調製する、あるいは1つの試料から複数の試料溶液を作製する等の方法を用いて、変動を小さくする必要がある。

表面に脊髄組織  $50 \mu\text{g}$  が存在すれば、拭取りテストで検出が可能であり、肉中に 0.02%の脊髄組織が存在していれば、RIDA スクリーンで検出が可能である。肉中の脊髄組織を綿棒で採取し、拭取りテストで検出する方法は簡便であるが、0.2%程度までの検出であり、再現性も低い。

## 2. 背割り前脊髄除去方法の評価

吸引式では、脊髄除去率が高いものは拭取りテストによる吸光度が低い、硬膜が吸引されない。一方、大阪押出式では、脊髄の除去率が高くても拭取りテストによる吸光度が高い傾向にあるが、同じ押出式でも押出圧力を改良した千葉押出式では、脊髄の除去率が高いものに拭取りテストによる吸光度が低い傾向がみられる。

今回の調査では、吸引式及び押出式のどちらが優れているという結論には達しなかったが、神奈川県データと併せて検討すると、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る。

## 3. スタンニング及びピッシングの影響による血液中のCNSについて

生前血の血清又は血漿で高い吸光度を示した事例があり、この原因としては、外部からのCNS組織のコンタミネーション、ELISA の非特異的反応等が原因と考えられるが、血液中に GFAP が元々含まれていたという考え方も否定できない。また、生



前血の血清よりも心残血の血清の方が高い値を示したのも一例あったこと、とさつ方法によっては、CNS組織が血液を介して他の臓器へ移行するとの報告もある (Schmidt G.R.et al.J.Food Prot.62:390-393) ことから、今回の調査結果だけでピッシングによるCNS組織の血液中への混入はないと結論付けるのは早計と思われる。松田の報告は、血液中におけるCNS組織に対する検出キットの評価には触れていないことから、この部分における基礎実験を行い、その結果を踏まえて、スタンニング及びピッシングの影響を評価する方法を検討確立する必要がある。

#### 4. くず肉（脊椎付着肉）中のCNSについて

今回の調査では、測定値は1例を除いてすべて定量下限値未満であった。値が高かったものについては、検査に供した部位が脂肪の多い部分であり、脂肪とともに肉がウェル壁に付着し、肉中のペルオキシデースが基質/発色液と反応したこと、脊髄から分枝している座骨神経等の太い神経が含まれていたこと等が原因として考えられるが、松田の報告によると、肉中のCNS検出結果にはかなりばらつきがあること、肉中の成分による妨害により、実際に含まれているCNS濃度を反映しない場合があること等が考えられるので、1回だけの試験だけで結論を出すのではなく、同一検体を複数回試験することが必要と思われる。今後は、松田の行った基礎実験を参考に調査方法を確立し、調査を継続していく必要がある。

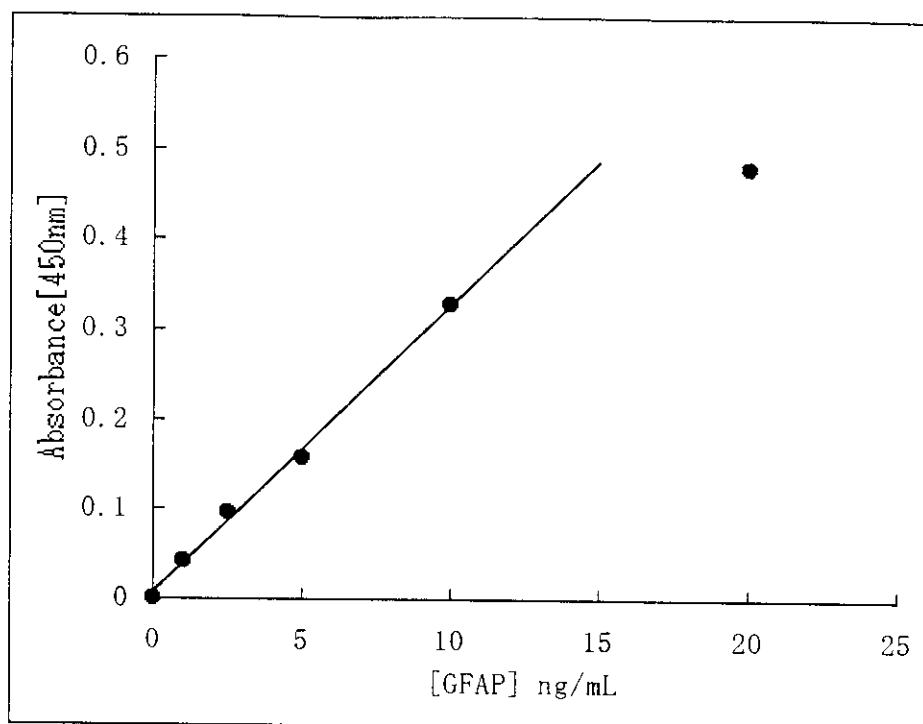


Figure 1 GFAP の検量線 (拭取りテスト)

Table 1 拭取りテストによる脊髄懸濁液の測定範囲

濃度	部位 1				部位 2			
	1	2	平均	平均－ ブランク	1	2	平均	平均－ ブランク
10 $\mu\text{g/mL}$	0.812	0.864	0.838	0.506	0.798	0.862	0.830	0.498
20	1.288	1.349	1.319	0.987	1.294	1.479	1.387	1.055
50	2.706	2.419	2.563	2.231	2.508	2.482	2.495	2.163
100	>3	>3			>3	>3		
ブランク	0.332	0.332	0.332		0.339	0.350	0.345	
0.2%標準	0.686	0.690	0.688	0.356	0.705	0.720	0.713	0.381

**Table 2** ガラス板からのふき取り試験結果

脊髓量	1	2	平均	平均 - 0%標準
100 µg	1.938	1.775	1.857	1.505
100	2.233	2.054	2.144	1.792
50	1.341	1.363	1.352	1.000
50	1.045	1.024	1.035	0.683
ブランク	0.356	0.348	0.352	
0.2%標準溶液	0.703	0.708	0.706	0.354
25 µg	0.424	0.442	0.433	0.090
25	0.398	0.410	0.404	0.061
10	0.343	0.343	0.343	-0.001
10	0.327	0.332	0.330	-0.014
ブランク	0.334	0.353	0.344	
0.2%標準溶液	0.566	0.630	0.598	0.354

**Table 3** 肉表面からのふき取り試験

脊髓量	1	2	平均	平均 - 0%標準
40 µg	0.614	0.647	0.631	0.273
40	0.672	0.669	0.671	0.313
20	0.465	0.474	0.470	0.112
20	0.543	0.529	0.536	0.178
ブランク	0.345	0.371	0.358	
0.2%標準溶液	0.623	0.637	0.630	0.272

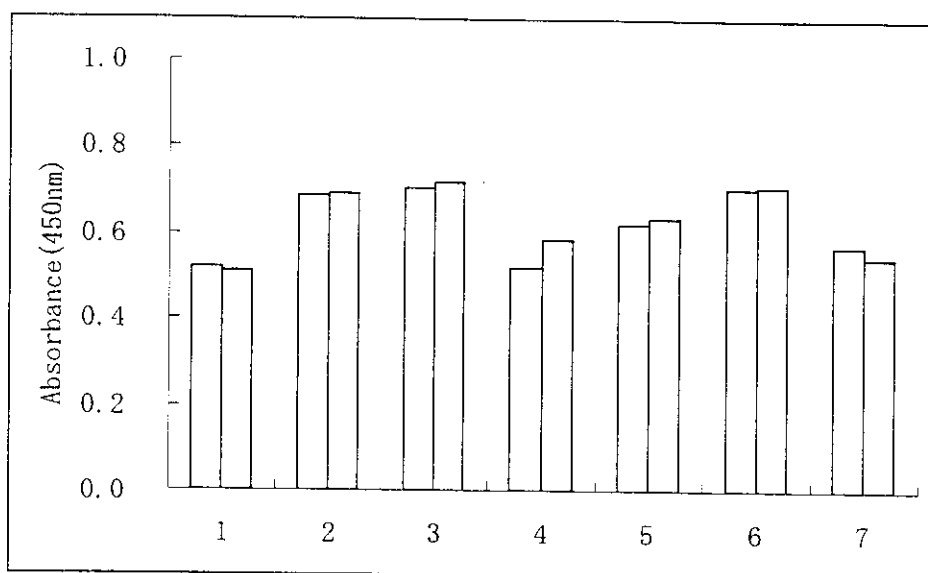


Figure 2 拭取り試験による 0.2%標準溶液の吸光度の再現性

Table 4 RD スクリーンによる 脊髄懸濁液の測定範囲

濃度	1	2	平均	平均 - blank
5 $\mu\text{g/mL}$	1.21	1.113	0.8815	0.7845
10	1.723	1.479	1.3945	1.1505
20	2.855	2.705	2.5265	2.3765
50	>3	>3		
blank	0.34	0.317	0.3285	
0.5	0.411	0.435	0.423	0.1335
1	0.508	0.547	0.5275	0.238
2	0.641	0.671	0.656	0.3665
5	0.971	1.021	0.996	0.7065
blank	0.295	0.284	0.2895	