

## E. 結 論

日本で食されている羊と山羊の PrP 遺伝子のアミノ酸多型が明らかとなった。羊では野生型と共に抵抗性の遺伝子型が多かった。一方、山羊では野生型が圧倒的に多く、抵抗性型は少なかった。牛の PrP 遺伝子は全般的にアミノ酸多型を有するホルスタイン牛は少なかった。一部の牛で大きな欠失領域を有する牛の存在が確認された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., Serjmyadag, D., Byambaa, B. and Shinagawa, M. (2003) Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.*, 65:75-81.
- 2) Horiuchi, M., Nemoto, T., Ishiguro, N., Furuoka, H., Mohri, S. and Shinagawa, M. (2002) Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 40:3421-3426.

### 2. 学会発表

- 1) 毛利 崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一：免疫磁性ビーズを用いた PrP<sup>Sc</sup> 検出法の開発 第 133 回日本獣医学会（東京）2002 年 4 月
- 2) 堀内基広、石黒直隆、品川森一、古岡秀文、北村延夫：経口ルートによるプリオンの感染成立には消化管リンパ装置の存在が必要である 第 133 回日本獣医学会（東京）2002 年 4 月
- 3) 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：抗 PrP モノクローナル抗体のパネルの作成と抗体による PrP<sup>Sc</sup> 産生阻害 第 133 回日本獣医学会（東京）2002 年 4 月
- 4) 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、古岡秀文、木村久美子：モノクローナル抗体 6H10 の解析：PrP<sup>Sc</sup> 特異的抗体の可能

性 第 133 回日本獣医学会（東京）2002 年 4 月

- 5) 堀内基広、石黒直隆、品川森一、古岡秀文、北村延夫：経口ルートによるプリオンの感染成立には消化管リンパ装置の存在が必要である 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- 6) 田村勇耕、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一：尿崩症を誘発するマウス馴化スクレイピー株の分離 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- 7) 工藤聡子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、横山 隆、梅谷 淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫生化学的 BSE 診断技術の感度・操作性の改良 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月
- 8) 大林浩二、堀内基広、石黒直隆、品川森一：Peptide phage display 法によるプリオン蛋白質と反応する peptide の探索 第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002 年 10 月

表 1. 調査した羊の PrP 遺伝子の遺伝子型

PrP 遺伝子の遺伝子型				由来	頭数
112	136	154	171		
M	A	R	Q	栃木、青森、宮城、佐賀	60
M	A	R	Q	栃木、宮城、石川	14
M	A	R	R	栃木、宮城	32
M	A	R	R	栃木、青森	4
M	V	R	Q	栃木	1
M	A	R	R	栃木、青森、宮城	5
T	A	R	Q	栃木	1
合計				5自治体	117

表 2. アミノ酸多型による山羊 PrP 遺伝子アリルの分類

アリル型	102	127	142	143	146	211	240	アリルの数
1	W	G	I	H	N	R	S	70
2	-	-	-	-	-	-	P	64
3	G	-	-	-	-	-	-	2
4	-	S	-	-	-	-	P	1
5	-	-	M	-	-	-	P	8
6	-	-	-	R	-	-	P	7
7	-	-	-	-	S	-	P	4
8	-	-	-	-	-	Q	-	6
合計								162

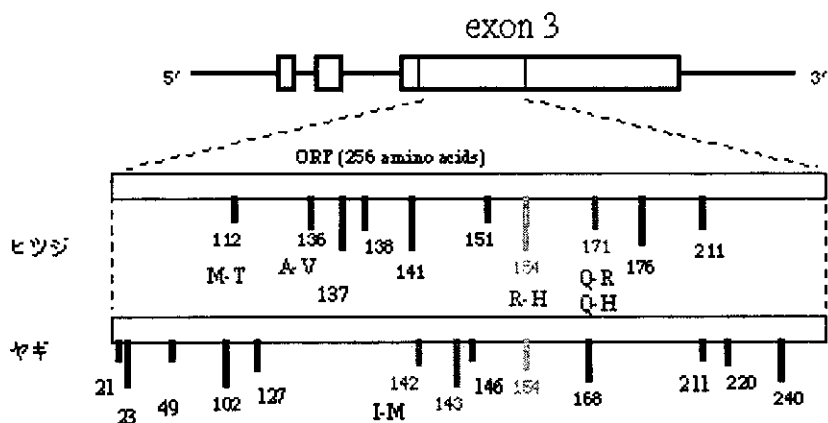


図1 ヒツジとヤギのPRP遺伝子の構造とアミノ酸多型

PCRによるコード領域の増幅

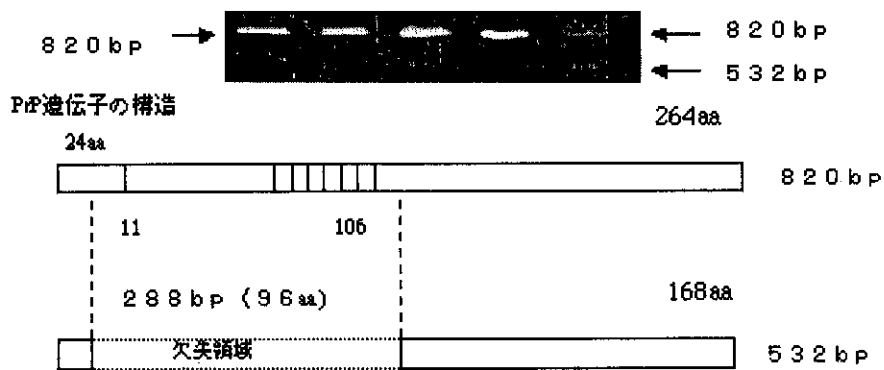


図2 欠失領域を有するウシPRP遺伝子の分離

## 5. 牛海綿状脳症の病理診断に関する研究

主任研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部  
研究協力者 佐藤由子、樋口好美、長谷川秀樹、永田典代  
中島典子、岩田奈織子、高橋秀宗（同感染病理部）  
古岡秀文（帯畜大病態獣医学）  
沢谷広志（神奈川県食肉衛生検査所）  
山野 洋（和歌山市保健所食肉衛生検査室）

**研究要旨** わが国の BSE 検査のうち確認検査で用いられる迅速病理・免疫組織化学法を開発した。検体を受付してから 1 日半で免疫組織化学の結果を出せ、しかも海綿状態の診断に必要な形態保持も十分であった。この方法をマニュアル化し、必要な食肉衛生検査所に配布する予定である。しかしながら迅速性においてはやや不満が残るので、全工程を 1 日で終了しうる方法を開発したい。一方、BSE 陽性と判定された神奈川例および和歌山例についてはほぼ全身の臓器組織について検討する機会を得た。大脳基底核や灰白質、小脳核および分子層や顆粒層、全長脊髄の灰白質、神経節の衛星細胞、回腸のアウエルバッハ神経叢に PrP<sup>Sc</sup> の沈着を認めた。リンパ組織には陰性であった。これらの結果は、現在のと畜場での特定部位の除去や、今後のと畜方法の改良に根拠を与えるものになると考えられる。

### A. 研究目的

わが国の BSE 検査はと畜される牛の全頭を対象とし、と畜場で特定部位（脳、脊髄、眼、回腸、扁桃）を除去した後、食肉衛生検査所で延髄門部を採取し ELISA 法でスクリーニング検査が行われている。再検査でも疑陽性を示した延髄標本は凍結およびホルマリン固定後に確認検査に回される。確認検査は枝肉の商品価値の問題から乳牛は 3 日以内、肉牛は 5 日以内に結果を出すことが求められている。そのため、確認検査には 1 日半程度の時間的余裕しかないのが現状である。ウエスタンプロット検査は午前 9 時に受け付けると夕方には結果が判明する。しかし、病理組織および免疫組織化学検査には、形態観察のために形態保持を目的とした組織の十分なホルマリン固定、脱脂そしてパラフィン包埋処理過程が重要であるため、通常の方法では短時間で行うことは困難であると考えられている。そこで脳組織の迅速標本作製および病理・免疫組織化学検査が可能となる方法について開発し、さらに実際の病理免疫組織

化学検査でその応用について検討することを目的とした。さらに、わが国の BSE 例で、多くの組織採材が可能であった神奈川例および和歌山例について病理免疫組織化学的に検討し、正確な BSE の知識に役立てることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) ウシ延髄組織およびプリオン病病理組織

BSE のないウシ延髄組織は帯広畜産大学で病理解剖されたウシから分与して頂いた。BSE 陽性ウシの延髄組織は動物衛生研究所からパラフィン切片として分与された。ほかスクレイピー組織標本は帯広畜産大学、スクレイピープリオン接種カニクイサル組織は感染研筑波医学実験用霊長類センター、スクレイピー帯広 1 株接種マウス組織は感染研細胞化学部から分与された。いずれもホルマリン固定され、ギ酸処理されたものをパラフィン包埋した組織標本である。

## 2) 抗プリオン抗体

ウシプリオンに対する抗体は、ウサギ抗体(B103)およびマウスモノクローナル抗体(43C5、44B1)は帯畜大品川先生および堀内先生から、そしてDT1 およびDT2 のマウスモノクローナル抗体は動衛研横山先生から分与していただいた。ウシプリオンペプチドウサギ抗体(T4)は感染研感染病理部の高橋が作製したものをを用いた。

## 3) 病理標本作製方法

食肉衛生検査所では夕方頃にホルマリン固定されると推測されるので、翌日の朝9時に感染研で受付するまで一晩15-20%ホルマリンで固定されている。しかし外側は固定されているものの、内部はまだ柔らかい状態である。門部でまず横断し、その後、頭側および尾側に3mmの厚さで割を加え、門部から頭側3個の組織を切り出し、頭側面を薄切するように、プラスチックカセットに入れた。60°Cで1時間振盪しながら50%ホルマリン(ユフィックス、サクラ)で固定し、その後98%ギ酸で室温1時間振盪しながら処理した。水洗30分を行いギ酸を十分除去したのち、自動包埋器で4.5時間のプロトコールでパラフィンに包埋した。4µmの切片を薄切後乾燥し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い形態観察を行った。

確認検査として受付ける検体はバイオセーフティレベル2であるが、プリオンの性状を勘案し、当研究所では取り扱いについて安全管理規程に細かく定めている。切り出しは安全キャビネット内で行い、少なくともギ酸処理までは取り扱いに十分注意し、すべての廃液等は専用タンクに保管し、プリオン用検体の取り扱い後の廃液であることを明示して医療廃棄物業者に焼却を依頼した。またすべての作業に用いたものは1N NaOHでふき取り1時間放置するか、135°C 60分のオートクレーブ処理後に、同様に医療廃棄物業者に焼却を依頼した。

## 4) 免疫組織化学法

脱パラ水洗後に一旦乾燥して切片を貼り付

けてから、600 ml のステンレスバット内に1mM HCl を400 ml 満たし蓋をしてから121°C 20 分のオートクレーブで切片を前処理した。この過程で正常プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)は破壊され消失すると同時に、異常プリオン蛋白質の抗原性を賦活化することが可能であった。実際は蒸留水やクエン酸等の溶液でも検討を行った。室温に戻して洗浄後、3%過酸化水素水-メタノール室温5分で内因性のペルオキシダーゼを不活化し、正常10%ヤギ血清を室温10分反応させ非特異反応を防止した。一次抗体(前出)を500ないし1,000倍にPBSで希釈し、37°C 45分反応させた。洗浄後に、Envision+ (Dako)を室温30分反応させ、その後DABで発色反応を行い、ヘマトキシリンで核染を行った。なお、BSE陽性ウシ延髄標本あるいはスクレイピー接種マウス脳を陽性対照とした。

## 5) BSE陽性ウシ検体

平成14年8月23日にBSE陽性と判明した神奈川県例については、牛海綿状脳症特別措置法に基づいて「牛特定部位使用申請書」を神奈川県衛生部に提出し許可を受けた後、神奈川県食肉衛生検査所の沢谷所長をはじめとする方々に採材をお願いした。脊髄、神経節、回腸ほか主要臓器、リンパ節、扁桃などほぼ全臓器について凍結およびホルマリン固定組織検体を採取することができた。頭部はと畜場内で開頭できないために、剥皮と一部の切除後に前頭側および大後頭孔からホルマリンを注入して固定していただいた。後に感染研のBSL-2の解剖室で開頭した。平成15年1月20日にBSE陽性と判明した和歌山例については、同様に手続きを行った後、和歌山市食肉衛生検査室に採材をお願いした。大脳、脊髄、回腸ほか主要臓器の凍結およびホルマリン固定検体を採材することができた。

(倫理面への配慮)

行政検査として行われている動物検体であり、また牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し許可を得たものであり、倫理上問題はない。

## C. 研究結果

### 1) パラフィン包埋方法

脳組織は十分な固定と脱脂が必要とされ、通常、パラフィン包埋にはほぼ2週間程度を要する。スクリーニング検査に1日を要するので、確認検査としての病理免疫組織化学検査に使える時間は2日以内である。免疫染色には半日程度を要すると考えられるので、ほぼ1日以内に固定と包埋が完了することが必要である。帯畜大の古岡らの検討により、60°C 1時間の振盪加温ホルマリン固定と室温 1時間のギ酸処理方法、そして自動包埋器による4.5時間のプロトコールがほぼ確立されていたので、これを基本とし応用することにした。自動包埋器の時間を2時間ないし3時間に短縮しても、標本へのパラフィン浸透が悪くまた組織切片の収縮が起こり、とても使用に耐えられなかった。そのため、固定・ギ酸処理・包埋方法については古岡の方法に準ずることにした。形態保存は良好であり、もし海綿状変化が存在したとしても十分に判定が可能であると考えられた(図1)。

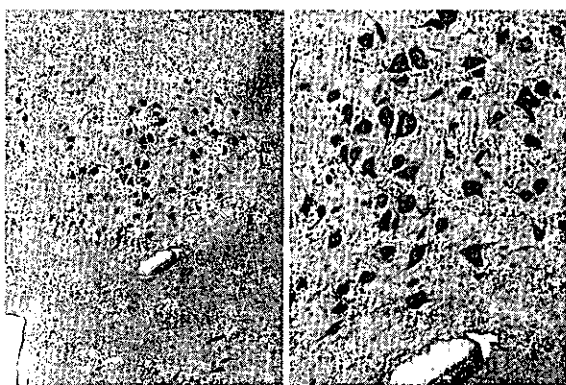


図1. 迅速病理・免疫組織化学法で作製した延髄標本(HE染色)。迷走神経背側核。病理組織学的検討には十分な組織形態が保持されている。

### 2) 免疫組織化学法

切片の前処理として組織中の PrP<sup>C</sup> を除去し、同時に PrP<sup>Sc</sup> の抗原性の賦活化を必要とするのがプリオン免疫染色法の特徴である。初期には蒸留水でのオートクレーブが行われたが、賦活化法としては十分とはいえず、また核に非特異染色がみられることからほかの方法を試してみた。通常免疫染色に用いるクエン酸緩衝液では効果がなかったため、北本らの方法により

希塩酸処理を行った。3 mM では組織切片が破壊され、核が抜け消失してしまった。ホルマリン固定条件が短いため組織固定が不十分であるためと考えた。しかし固定条件を変更することなしに、塩酸濃度を検討したところ、1 mM の希塩酸でオートクレーブすることによりかなりの抗原賦活化が可能となり、一方で組織破壊を防ぐことが出来た。しかし、何回か繰り返してくるとその条件が一定しないため、ステンレス製のバットのサイズを一定とし、希塩酸の量も一定とし、しかもバットの蓋をするという条件で、初めて一定した前処理効果を得ることができた。この免疫染色法を含めて表1としてまとめた。

免疫染色法では抗体の性状が大きな検出感度の差異となるので、現在使用可能なモノクローナル抗体やペプチドを抗原としたウサギポリクローナル抗体を用いて、種々の動物プリオン病組織切片で検討を行った。前処理法として1 mM HCl 溶液中での121°C 20分のオートクレーブ処理を前提とした。その結果、B103 抗体では軽度の背景および核に非特異染色がみられるがほぼ良好な結果が得られた。しかし T4 抗体では非特異染色がみられず良好な染色結果を得ることができ、この免疫染色結果が最も良いと考えられた(図2)。モノクローナル抗

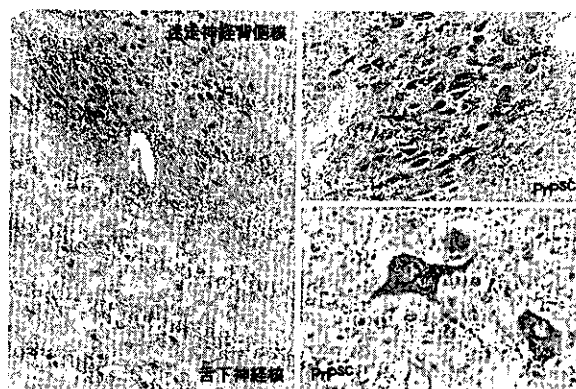


図2. 北海道例の免疫組織化学染色で PrP<sup>Sc</sup> を検出したもの。神経網や神経細胞に粗大顆粒状の陽性所見がみられる。

体ではウエスタンブロットの結果とはやや異なり、染色力価は低下するが44B1 がもっともよく、DT1 が続いた。43C5 は、陽性シグナルは強いが背景の非特異染色が強いことが多く問題を残した(表2)。

## 迅速免疫組織化学検査によるBSE-PrP<sup>SC</sup>検出方法

(国立感染症研究所 2002.1)

• 15%ホルマリン固定 (食肉衛生検査所+輸送)	短時間固定
• 3 mm厚で切り出し後、 <u>60°C 1時間再固定</u>	
• 98%ギ酸処理、室温1時間 振盪	検体到着
• パラフィン包埋 (自動包埋器、4.5 h - 一晚)	時刻次第
• 薄切	4 μm切片
• 1 mM HCl中でオートクレーブ121°C, 20分	脱パラ後に
• 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -メタノール 5分	乾燥させる
• 10%正常ヤギ血清-PBS、室温10分	
• 抗PrP <sup>SC</sup> ウサギ抗体 37°C, 45分~1時間	
• Envision+ (Dako) 室温, 30分	
• 発色 DAB 40 mg/Tris 200ml, 100 μl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 5分	
• 蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで、室温 1分	4.5時間
• 蒸留水で洗浄後、脱水、透徹、封入	

表1. 迅速病理・免疫組織化学法。詳細は本文参照。

## Reactivity of Antibodies against PrP<sup>SC</sup>

By routine staining method

	43C5 x2,000	44B1 x500	DT1 x500	DT2 x500	B103 x1,000	T4 x1,000
Hokkaido	2+	1+	2+	+w	2+	3+
Saitama	3+	3+	3+	2+	3+	3+
F	2+ (3+ O/N)	- (+w O/N)	1+ (2+O/N)	- (+w O/N)	- (-)	+w (2+ O/N)
Negative	-	-	-	-	-	-
Scrapie	3+	1+	3+/B	1+	3+	3+
Scrapie- Sq. Monkey	-	1+	2+	+ Plaque	+w	3+
Mouse	1+B	2+	2+	2+	+w	2+

表2. PrP<sup>SC</sup> の検出に用いた抗体の反応性を示す。迅速法で検出した。

検出法については、3%過酸化水素メタノールによる内因性ペルオキシダーゼのブロックや非特異染色の低下を目的とした 10%正常ヤギ血清との反応はやはり必要であることが判明した。Envision+が最も良く、通常使われるLSAB 法では検出感度がやや低下した。

GFAP やシナプトフィジン等のプリオン染色との二重免疫染色についても検討したが、問題なく行えることを確認した。

BSE ウシ延髄組織での陽性所見は、神経網や神経細胞とその樹状突起の細胞表面および神経細胞内に顆粒状の所見が得られた。非特異染色としてB103, T4や43C5抗体ではときに細胞質内にびまん性の陽性所見がみられた。両者を比較し、また抗体を変えて検討したところ、前述した顆粒状染色所見が本来の陽性所見であることが判明した。また迷走神経背側核直上(第4脳室側)にある最後野には小血管が多く、その周囲に非特異染色がみられることがあった。

### 3) BSE 陽性検体

動衛研から提供された英国獣医学研究所からの分与組織切片では、PrP<sup>Sc</sup> は延髄の両側にほぼ均等に分布していた。どちら側を採取しても問題はないことが判明した。

### 4) わが国での BSE 陽性検体

#### (1) 神奈川県について

最初に受付けた延髄組織は全部を頭側から尾側にかけて厚さ 3mm で切り出しすべてを包埋し、HE 染色と免疫染色を行った。その結果、海綿状変化はみとめられなかった。また免疫染色では、延髄門部では陽性所見が得られたもののほかの部位ではごくわずかの神経細胞に陽性所見がみられた。例えば高倍率での写真撮影で一つないし二つの細胞が陽性所見を示すのみであった。この結果は山河らのウエスタンブロットの結果とよく一致するものと考えられた。

大脳底部の皮質や基底核(図3)、小脳では神経網とともに神経細胞に顆粒状の陽性所見が得られたが、一旦凍結されて固定されたため、

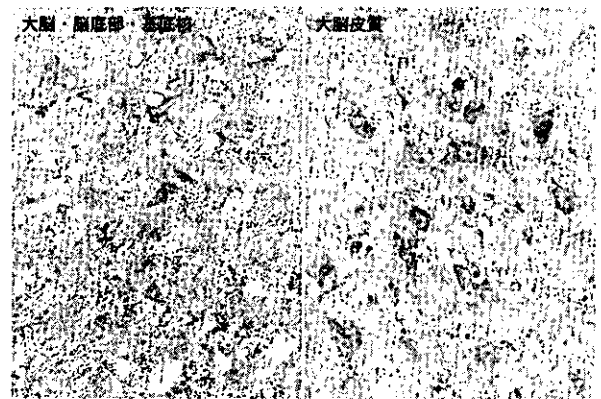


図3. 神奈川県の大脳の PrPSC 免疫染色結果。

凍結による人工産物が形成され海綿状変化はあきらかではなかった。また、脊髄では頸部から尾部までの灰白質にすべて陽性で、前角よりも後角に強く陽性所見が得られた。また、海綿

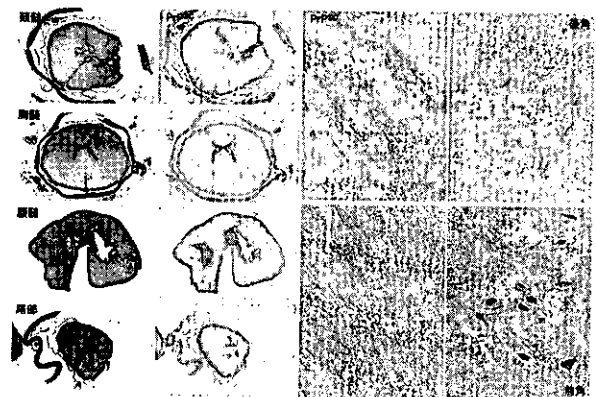


図4. 神奈川県の大脳の PrPSC 免疫染色結果。頸髄から尾部までの灰白質に陽性。

状変化は認めなかった(図4)。採取された神経節組織ではところどころに神経節細胞の周囲に存在する衛星細胞の細胞質内に顆粒状の陽性所見が得られた(図5)。回腸末端から 2m

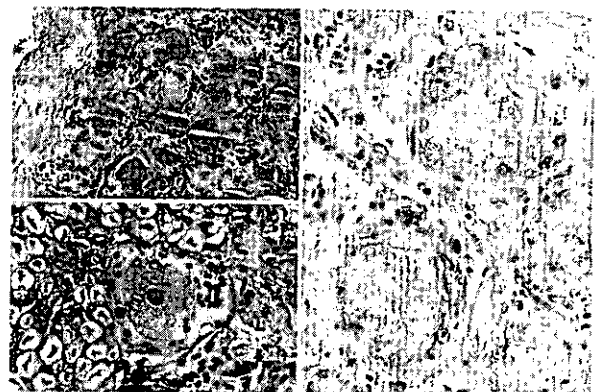


図5. 神経節の衛星細胞における PrPSC 免疫染色結果。顆粒状の陽性所見がみられる(右)。



以内の組織ではアウエルバッハ神経叢に顆粒状の陽性所見が得られた(図6)。ほか扁桃や多くのリンパ節、脾臓、パイエル板では陽性所見は得られず、また胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、副腎などの実質臓器や空腸、回腸末端から2 m以上6 mまでの回腸、大腸、膀胱、乳腺、筋肉などにはPrP<sup>SC</sup>の沈着は認められなかった。眼球の網膜や神経線維組織にも認められなかった。



図6. 神奈川例の回腸。アウエルバッハ神経叢にPrP<sup>SC</sup>が顆粒状に陽性である。

## (2) 和歌山例について

同様に延髄組織は全部標本に作製した。HE染色では迷走神経背側核の神経網そして神経細胞に明らかな海綿状変化が認められた。免疫染色でも神経線維を除くすべての部分において陽性所見が得られた。舌下神経核、孤束核、薄束核、疑核、顔面神経核、オリーブ核、網様体にも陽性所見が認められた(図7)。組織の保存、固定による形態保存、免疫染色結果のど

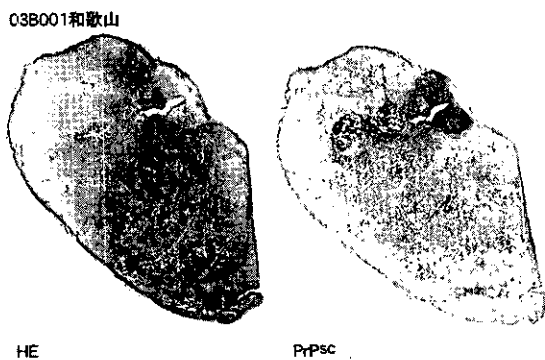


図7. 和歌山例の延髄門部。HE染色(左)、PrP<sup>SC</sup>免疫染色(右)。ほぼびまん性に沈着が認められる。迷走神経背側核には神経網の海綿状変化が認められた。

れをとっても、いままでのBSE陽性検体のなかで、もっとも強い陽性所見とともに、もっとも良好な組織変化の結果が得られた。

大脳では前頭葉、視床等の基底核、側頭葉下部の灰白質にある神経細胞と神経網に陽性所見が得られた。小脳では歯状核に強く、分子層や顆粒層でも一部が陽性となった(図8)。脊髄も神奈川例と同様、頸部から尾部のすべての灰白質に陽性であった。ほかの臓器については現在検討中である。

## D. 考察

今回確立した迅速病理免疫組織化学法はヨーロッパ諸国でも例がないほど早くしかも良好な結果が得られるものであることがはっきりした。またこれらの結果をもとに、より多くの食肉衛生検査所で確認検査が行えるように、マニュアルを作製することができた。しかしながら、畜産農家に委託されてと畜されるウシの迅速検査としてはやや不十分とも思われ、より早く固定・包埋する方法を検討し、朝9時に受付すれば夕方5時には結果がだせるような改良を続けていく予定である。

2頭のBSE陽性例についてはほぼ全身の臓器組織のPrP<sup>SC</sup>の分布を検討することができた。眼球以外に、大脳、脊髄、神経節、回腸末端部にPrP<sup>SC</sup>の沈着を認めたことから、特定部位の除去が本邦でも有用であることが判明した。とくに脊髄組織ではほぼ全長にわたる灰白質にPrP<sup>SC</sup>が沈着していることが明らかとなり、と畜方法について再検討が迫られる結果となった。一方でリンパ組織におけるPrP<sup>SC</sup>の沈着はスクレイピーと異なる大きな分布の違いであった。今後にあらたなBSE陽性ウシ検体が得られるならば、より詳細な検討が可能となるような準備をし、またより多くの臓器組織についてPrP<sup>SC</sup>の分布を明らかにすることで、わが国におけるBSE例の臨床症状との関連や発症機序についても解明が可能となると考えられる。

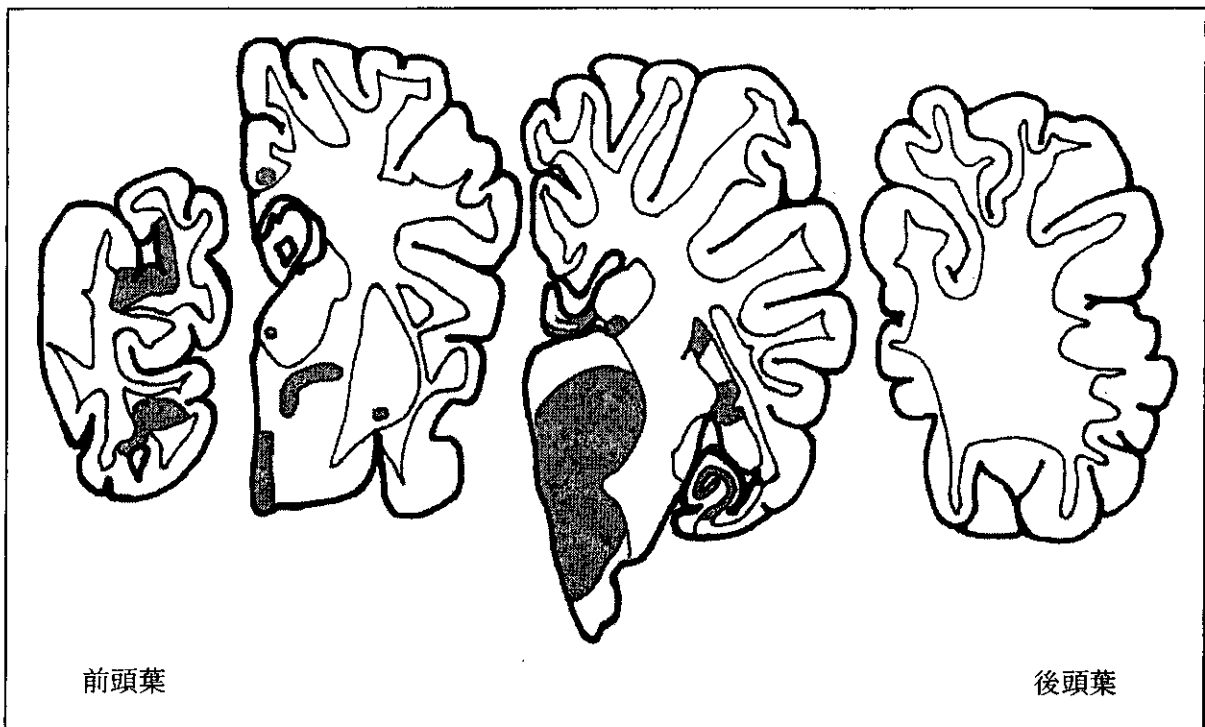


図 8. 和歌山例の脳における PrP<sup>SC</sup> の分布

#### E. 結 論

確認検査に用いることができる実用的な迅速病理・免疫組織化学法を開発した。また BSE 陽性例 2 例について全身を検索することにより BSE プリオンの沈着部位を明らかにすることができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし。
2. 学会発表 なし。

## 6. 動物プリオン病の病理学的診断に関する研究

— 全頭検査で摘発された BSE の病理 —

分担研究者 古岡秀文 帯広畜産大学病態獣医学講座助教授

**研究要旨** これまでに全頭検査で摘発された BSE 6 頭のうち、帯広畜産大学で病理学的確認検査を実施した 4 頭について詳細に検討を行った。猿払・北見例では迷走神経背側核にわずかな空胞形成とミクログリアの活性化を認めたが、組織学的診断には至らなかった。群馬・音別例では迷走神経背側核、孤束核、オリブ核、網様体辺縁部、稀に神経細胞体に空胞形成がみられたこと、アストログリア・ミクログリアの活性化あるいは増殖が観察されたことから、組織学的に BSE との診断が可能であった。免疫組織化学的な分布は、猿払・北見例では迷走神経背側核、孤束核、薄束核、楔状束核、オリブ核、網様体辺縁部などに限定していた。組織学的に BSE と診断可能であった群馬・音別例の免疫組織化学的な分布は、組織学的所見の得られた部位に加え、疑核、顔面神経核、三叉神経脊髄路核等に陽性所見がみられた。つまり、BSE の初期においては迷走神経背側核が極めて強く侵されること、ついで知覚核、中継路核に拡がる傾向があること、運動核は侵されないか比較的軽度であること、が明らかになった。このことから全頭検査実施に際しての延髄門部分の検査は、本邦における BSE の病理学的検索からも妥当であることが確認された。また、神経系以外の検索が可能であった音別例では、採材部位が限られていたものの、口蓋扁桃を含むリンパ節、末梢神経系、骨格筋はいずれも陰性で、過去の報告に矛盾する結果は得られていない。

### A. 研究目的

BSE の病理像については英国を中心にして多数報告がある。しかしながら、報告の多くは一般的に臨床型とも呼ばれる臨床症状を伴う症例が大部分で、と畜検査の際に摘発された臨床症状を伴わない BSE、いわゆる準臨床型 BSE に関する病理学的な報告はほとんどなされていないのが現状である。このことはと畜検査で摘発される BSE に関する病理学的な知見が世界的にもほとんど集積されていないことを意味している。

本研究では国内のと畜検査で摘発された BSE を病理学的に検索することで初期の病態を明らかにするとともに、病理学的な基礎的データの蓄積を行う。また、現在全国のと畜場で実施している ELISA によるスクリーニング検査や確認検査に関して病理学的な根拠を示す。すなわち、ELISA 検査や WB の採材部位である

延髄門部分における病変分布、蓄積状況を明らかにすることで、これら検査の有用性に関する評価のためのデータを提供する。また、神経系以外の臓器が採材できた症例については、免疫組織化学的検査によるプリオン蛋白の体内分布についても明らかにする。

### B. 研究方法

これまでに全頭検査で摘発された BSE 6 頭のうち、帯広畜産大学で病理学的確認検査を実施した 4 頭（北海道猿払例、群馬例北海道音別例、北海道北見例）について検索した。いずれも確認検査材料として送付された橋から延髄と頸髄の一部を含むホルマリン固定材料の全てを 3 から 5 mm に切り出し、蟻酸処理後、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切標本作製した。

標本は通常 hematoxylin-eosin 染色と抗プリ

オン抗体, 抗 GFAP 抗体により免疫組織化学的染色を実施した. この抗プリオン抗体による免疫組織化学的染色の結果を症例ごとに脳幹部神経核の地図上にその程度をプロットし, 神経解剖学的解析を行った. また, 音別例については脊髄および神経系以外の臓器が採材できたことからこれら臓器についても免疫組織化学的検索を行い, プリオン蛋白の体内分布状況について検索を行った.

なお, 当該研究は BSE 確認検査材料を用いた研究であり, 倫理面の問題はない.

### C. 研究結果

症例は組織学的には BSE との診断が不可能であった症例 (猿払例・北見例) と組織学的にも BSE と診断可能な症例 (群馬例・音別例) に分けられた.

猿払例, 北見例では組織学的に迷走神経背側核にわずかな空胞形成とミクログリアの活性化を認めたが, 組織学的診断には至らなかった (図 1).

群馬例・音別例では迷走神経背側核, 孤束核, オリーブ核, 網様体辺縁部, 稀に神経細胞体にも空胞形成がみられたこと, アストログリア・ミクログリアの活性化あるいは増殖が観察されたことから, 組織学的にも BSE との診断が可能であった (図 2).

免疫組織化学的にはいずれの症例も陽性を示し, 線状, 微細顆粒状, 神経細胞周囲を取り巻くような染色パターンを示した. 病変が比較的軽度のものでは, 苔状あるいは塊状といった染色パターンを示すものもみられている. (図 3).

免疫組織化学的な分布は, 猿払・北見例では迷走神経背側核, 孤束核, 薄束核, 楔状束核, オリーブ核, 網様体辺縁部などに限定していた (図 4). 組織学的に BSE と診断可能であった群馬・音別例の免疫組織化学的分布は, 組織学的所見の得られた部位に加え, 疑核, 顔面神経核, 三叉神経脊髄路核等に陽性所見がみられたが, その程度は臨床型 BSE に比較して軽度であった (図 5).

音別例については脳幹部以外に脊髄, 脊髄神経節, 交感神経幹を含む末梢神経系, 扁桃を含

むリンパ節, 骨格筋等について病理学的検索を行い, 脊髄および脊髄神経節で陽性所見が得られたが, 他はいずれも陰性だった (表 1). 脊髄では組織学的に灰白質背角の辺縁に沿って空胞形成がみられ, 免疫組織化学的染色では背角, 腹角はいずれも陽性であり, 特に背角の辺縁部に強い傾向が認められた. また, 脊髄白質は陰性だった. 脊髄神経節では, 神経細胞周囲の外套細胞に一致して陽性所見が得られた. なお, ウエスタンプロット法による検索結果についても表 1 に記載した.

また, 孤束核での抗プリオン抗体, 抗 GFAP 抗体による検索では, プリオン蛋白の蓄積がみられるものの, 空胞形成を伴わない症例ではアストログリアの活性化はほとんど観察されないのに対して, 空胞形成が顕著にみられるようになるに従い, アストログリアの活性化が明らかになる傾向がみられた.

検体	IHC	WB
視神経	N.E	+
延髄	+	+
脊髄	+	+
脊髄神経節	+	+
肋間神経	-	-
腕神経叢	-	-
交感神経幹	-	-
口蓋扁桃	-	-
リンパ節	-	-
横隔膜	-	-
肋間筋	-	-
その他骨格筋	-	-
耳下腺/下顎腺	N.E	N.E
腎臓/大静脈	N.E	N.E

表 1

### D. 考 察

臨床型 BSE の病理組織所見は神経細胞体や神経網の空胞形成を特徴とし, 免疫組織化学的には, 小班状や線状の陽性所見を示し, 神経細胞体やその突起, あるいは神経網の空胞を縁取るようにみられる. 免疫組織化学的所見を含めた病変の分布は延髄を中心として脳幹, 視床が軽度で, 中脳では赤核, 三叉神経中脳路核, 橋, 延髄では前庭神経核, 孤束核, 三叉神経脊髄路核, 網様体を中心にみられる.

一方、今回検索した症例のうち猿払・北見例では、組織学的な変化はほとんど欠くか、あっても極めて軽度であり、BSEの初期の病態を示していた。これら症例では免疫組織化学的には迷走神経背側核、知覚神経核である孤束核、薄束核、楔状束核、中継路核であるオリブ核、網様体が陽性であったが、舌下神経核、顔面神経核をはじめとする運動核は陰性を示した。また、組織学的な変化を伴う群馬・音別例においても、運動核でのプリオン蛋白の蓄積は軽度であった。このことから、BSEの初期においては迷走神経背側核が極めて強く侵されること、ついで知覚核、中継路核に広がる傾向があること、運動核は侵されないか比較的軽度であること、が明らかになった。

最近ハムスターを用いたスクレイピーの感染実験から中枢神経系への初期の感染ルート、あるいは侵入門戸として副交感神経である迷走神経、交感神経が重要であることが報告されている。今回の検索で明らかになったBSEの初期の病態と陽性分布は、BSEについても中枢神経系への侵入門戸として副交感神経が矛盾していないことを示していた。一方、孤束核をはじめとする知覚核、および脊髄神経節が陽性を示したことは、比較的早期より知覚神経路の重要性を示唆する所見と考えられた。しかしながら、副交感神経より迷走神経背側核に侵入したプリオン蛋白が、孤束核をはじめとする知覚核に拡がり、これら神経核より遠心性に知覚神経路に到達する可能性も否定できないことから、今後近位、遠位迷走神経節、脊髄神経節等の積極的な検索が必要と考えられた。

今回得られたBSEの所見は、検索部位が極めて限定されているものの、羊スクレイピーや実験感染モデルの早期病変分布とも一致することから、BSEにおいても脳内の初期病変形成部位を迷走神経背側核とすることには矛盾がないと考えられる。このことは全頭検査実施に際しての門部分の検査が本邦におけるBSEの病理学的な検索からも科学的に妥当であることを裏付けられた。

音別例で採材できた神経系以外の臓器はいずれも陰性であった。神経系では特に、枝肉に分

布する交感神経幹についても病理学的検索では陰性であったことから、今後症例の積み重ね・採材部位の拡大は必要であるが、現時点では諸外国の結果に矛盾する成績は得られていない。

動物のプリオン病において、組織学的特徴である神経網や神経細胞体の空胞形成機序についての定まった見解は得られていない。今回の孤束核における検索ではある程度十分なプリオン蛋白の蓄積がみられるにもかかわらず、空胞形成はわずかにしか認められず、アストログリアの反応も極めて軽微であった。また、空胞形成が顕著になるに従い、アストログリアの反応も強くなる傾向がみられた。このことは、プリオン蛋白の蓄積に遅れて、空胞形成が生じ、ついでアストログリアの反応が生じていることを示していた。今後より詳細な検討が必要であるが、現時点ではこれまでの報告にあるようにプリオン蛋白の蓄積が組織にtoxicに働き、組織の傷害として空胞形成、その反応としてアストログリアの活性化が生じているものと考えられた。

## E. 結論

全頭検査で摘発されたBSE 4例の詳細な病理学的検索結果より、中枢神経系の侵入門戸として、副交感神経である迷走神経を經由した迷走神経背側核として矛盾がないことが明らかとなった。このことはBSE検査で延髄門部分の採材が極めて適当であることを示す。

また、神経系以外の検索が可能であった音別例では、採材部位が限られていたものの、口蓋扁桃を含むリンパ節、末梢神経系、骨格筋はいずれも陰性で、過去の報告に矛盾する結果は得られていない。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

スクレイピー感染マウスのアミロイド斑について：古岡秀文，堀内基広，石原孝介，松山好希，古林与志安，松井高峯，品川森一，第133回日本獣医学会（川崎）2002,4.

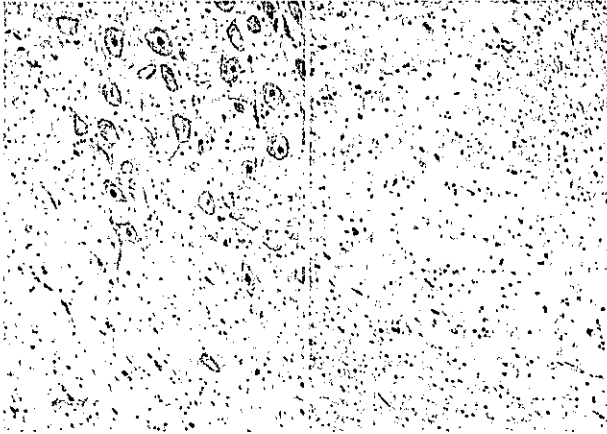


图 1

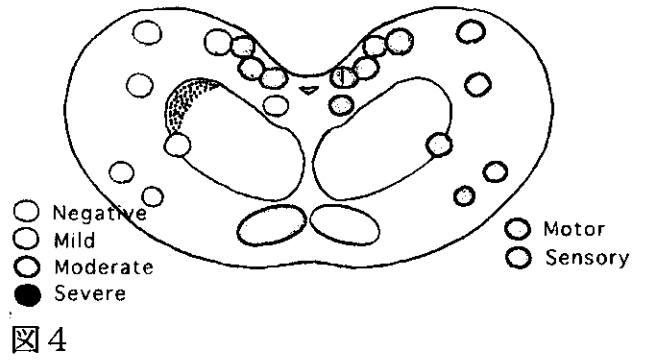


图 4

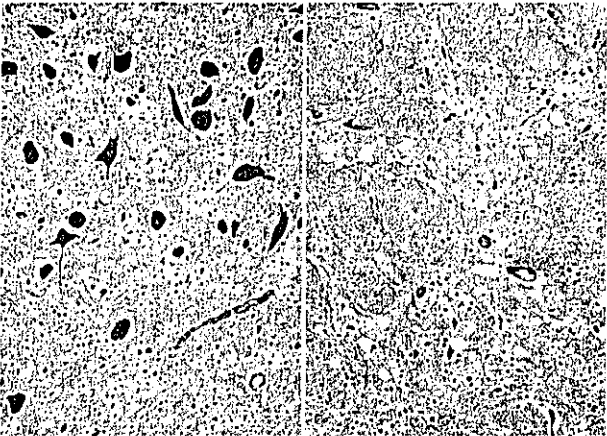


图 2

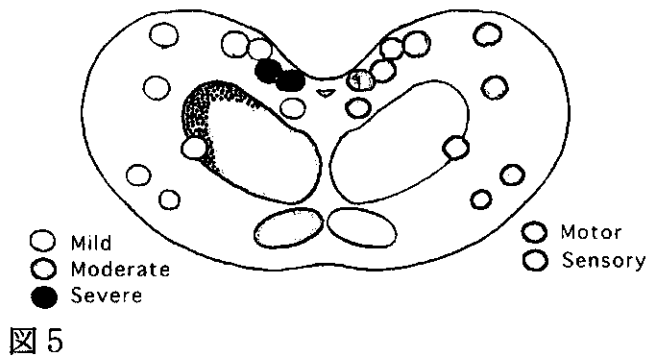


图 5

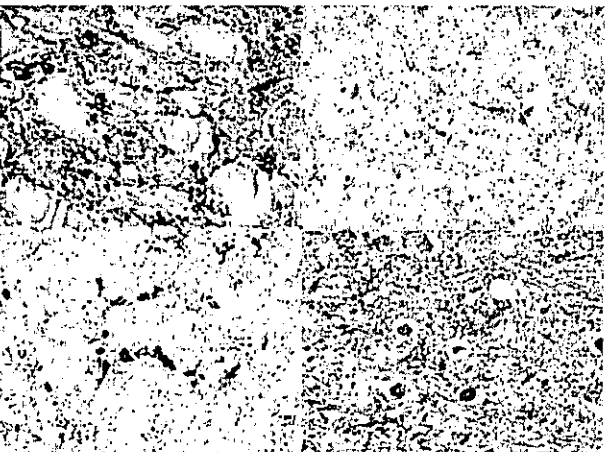


图 3

## 7. 異常型プリオンタンパク質の生化学的検出

—我が国5頭目のBSE陽性牛の異常型プリオンの組織分布—

分担研究者 山河芳夫 国立感染症研究所細胞化学部室長

**研究要旨** 厚生労働省により実施されている牛の全頭検査において、BSEに罹患していることが確認された牛（神奈川検体、H14.8月）の組織を用いて異常型プリオンタンパク質(PrP<sup>Sc</sup>)の生体内分布についてウエスタンブロット法を用いて詳細に検討した。その結果、特定危険部位とされている中枢神経系（脳、脊髄）、回腸遠位部及び、脊髄に接する神経節のうち、頸神経節、胸（6-7）神経節、腰神経節及び前殿神経節にPrP<sup>Sc</sup>の蓄積を認めたと、肩甲上神経、脛神経及び尾神経では検出限界以下であった。一方、各所のリンパ節、脾臓、扁桃及びその他の実質臓器（舌、小腸、心、肺、胃、膵臓、肝臓、骨髄、子宮、その他）にはPrP<sup>Sc</sup>の蓄積を認めることは出来なかった。

### A. 研究目的

BSEの確定診断に用いられているウエスタンブロット法(WB法)を用いて、BSE罹患牛におけるPrP<sup>Sc</sup>の組織分布を明らかにし、マウスのバイオアッセイ法を用いて欧州委員会が定めた牛の危険部位に関する知見との整合性を検討するとともに、脳試料の分析を目的として策定された現行のウエスタンブロット法の改良を試みる。

### B. 研究方法

**試料の調整:** 食肉検査所において採取された各部の試料約200mgから検査プロトコルに準拠して20%乳剤を調整した。乳剤は安井機械のマルチピースショッカー、ニッカトー製の直径1mmのタングステンビーズ(200mg)を用いて2000rpm回転、5分の処理で調整した。但し、リンパ節、骨髄などの硬い組織については、直径1.5mmのビーズで10分間乳化処理を行なった。

**酵素消化:** 組織乳剤は検査プロトコルに従って、コラーゲナーゼ、プロテイナーゼK(PK)及びDnase Iで順次消化した。なお、消化に先立って、反応液に5%の2-Butanolを加えて超音波処理をしておくことPrP<sup>Sc</sup>の同定の妨げとなるPrP<sup>C</sup>の切れ残りを減らすことができる。

**電気泳動/WB:** 概ね、検査プロトコルに準

拠して行なったが、検査時間の効率化を検討する目的でDRC社の8x4cmゲルも併せて用いた。この場合、SDS-電気泳動を400V、ブロッティングを40Vでそれぞれ行なうことが出来るので標準プロトコルでこれらのステップに要する時間(2時間)を30分に短縮することができる。

**抗体:** 1次抗体(抗プリオン抗体)は帯広畜産大学で作成したモノクローン抗体44B1(マウス)を主に使用したが、ペプチド抗体B103(ウサギ;ポリクローナル)も併用した。なお、何れの抗体も1μg/ml濃度で使用した。

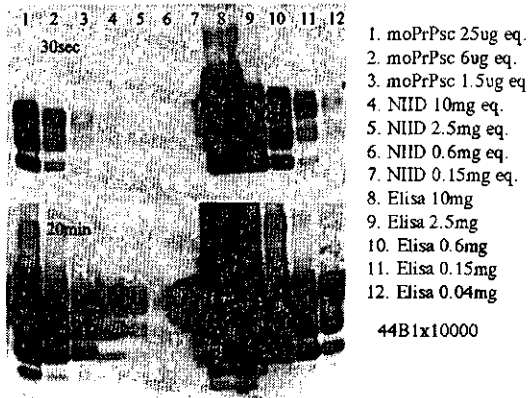
**定量:** ECL発色フィルムをスキャナーで取り込み、画像をNIH-Imageソフトウェアで数値化、定量した。このとき、同時に泳動、発色させたマウスプリオンタンパクの発色の程度を比較することにより、ゲル間のバラツキを補正した。

### C. 結果

**1.延髄門部におけるPrP<sup>Sc</sup>の分布:** 図-1に神奈川陽性牛のWB法による確定検査の結果を示す。食肉衛生検査所から送付された1次検査(エライザ)用の延髄門部の試料と当研究所で新たに切り出した試料ではPrP<sup>Sc</sup>の含量に大きな違いが認められた。

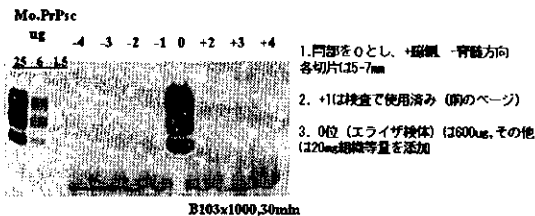
即ち、前者には少なくとも後者の250倍のPrP<sup>Sc</sup>が存在していた。このことを確認するため

図-1 神奈川県検体の2次検査



に、送付された延髄部分を 5mm 間隔で全て切り出し、PrP<sup>sc</sup> の分布を調べた。その結果、神奈川県陽性牛の延髄では PrP<sup>sc</sup> が存在しているのは 1 次検査様に切り出された門部の極めて狭い範囲に限られていることが判った (図-2)。

図-2 神奈川県陽性検体の延髄試料



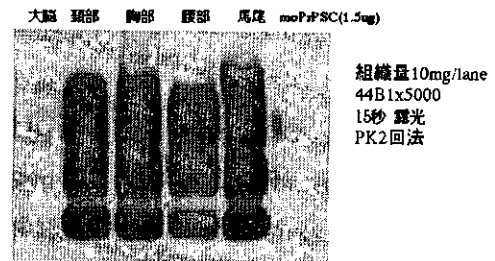
データには示さないが、現在検討中の和歌山陽性牛では PrP<sup>sc</sup> は神奈川県陽性牛に認められるような切り出し位置による極端な変動は認められなかった。上記の結果は一次検査用のサンプリングは延髄門部から正確に切り出すことの重要性を示している。

2. 脊髄及び神経節における PrP<sup>sc</sup> の分布：頸部、胸部、腰部及び馬尾の4ヶ所を脊髄試料として調べたが、脊髄の何れの部位でも PrP<sup>sc</sup> の強い蓄積を認めた (図3)。

脊髄に連続する神経節として、頸、胸 (6-7)、腰、前殿、肩甲上、脛及び尾神経を調べた。その結果、頸、胸 (6-7)、腰神経節には中程度、前殿神経節には PrP<sup>sc</sup> の弱い蓄積がそれぞれ認められたが、肩甲上、脛及び尾の神経節には PrP<sup>sc</sup> の蓄積は認められなかった (図-4)。

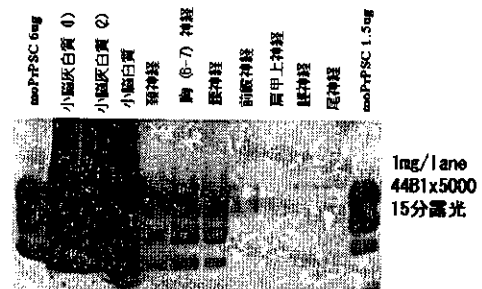
3. 脳における PrP<sup>sc</sup> の分布：神奈川県陽性牛の脳は、と畜後室温に数日間放置されていたために、殆ど自己融解しており詳しい解析を行なうことは出来なかった。小脳は比較的保存状態が良好であったので白質、灰白質に別けて解析することが可能であった (図-3)。小脳には白質、

図-3 神奈川県陽性検体 脊髄のWB



灰白質を問わず多量の PrP<sup>sc</sup> の蓄積があるが、今回、大脳試料として採取出来た部位 (前頭葉、及び頭頂葉周辺と思われる) への蓄積はそれほど多量であると考えられない。 (図-4)。

図-4 神奈川県陽性牛小脳および神経 (節) のWB



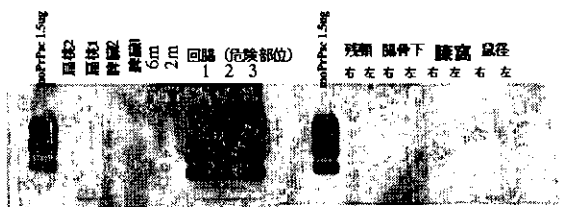
4. リンパ組織、リンパ節及び回腸遠位部における PrP<sup>sc</sup> の分布：

図-5 に示す様に駆幹リンパ節、リンパ組織 (脾臓、扁桃) には PrP<sup>sc</sup> の蓄積が認められなかった。図には示さないが、耳下腺、腸間膜、腎などの臓器リンパ節にも PrP<sup>sc</sup> の蓄積が認められない。一方、特定危険部位である回腸遠位部ではパイエル板を切り出した部位に中程度の蓄積が認められるが、危険部位から 2m、6m 前方では PrP<sup>sc</sup> を認めなかった。消化器管として、舌、食道、胃 (1-4 胃)、十二指腸、空腸、盲腸、



結腸及び直腸を分析したが何れの臓器にも PrP<sup>sc</sup> を認めることは出来なかった。その他、実質臓器として、心、肺、膀胱、卵巣子宮、乳房及び副腎にも PrP<sup>sc</sup> の蓄積が認められなかった。

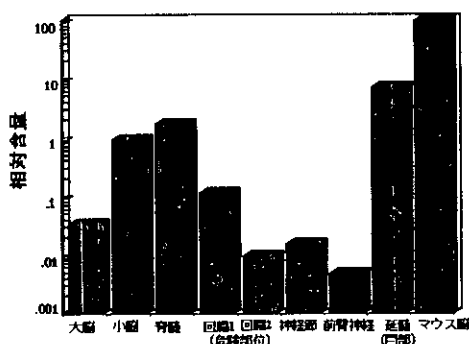
図-5 神奈川陽性検体リンパ節



### 5. 陽性部位における PrP<sup>sc</sup> の蓄積量の比較：

図-6 に WB 法で陽性となった部位における PrP<sup>sc</sup> の相対含量を示した。数値は、発症マウス脳で認められた PrP<sup>sc</sup> で normalize したものである。陽性となった部位では延髄門部に最も強い PrP<sup>sc</sup> の蓄積があり、以下>脊髄=小脳>回腸=大脳>神経節の順で蓄積量は低下していた。最も蓄積量が多い延髄門部と少ない前殿神経では単位重量当たり、PrP<sup>sc</sup> の蓄積に 1000 倍の違いがあった。

図-6 神奈川陽性検体における PrP<sup>sc</sup> の分布



### D/E. 考察/結論

現在まで我が国で7頭の BSE 罹患牛が発見されているが、神奈川 (H14. 8 月)、和歌山 (H. 15 年 1 月) の 2 例を除き検査に用いた延髄の一部が残っているのみである。本研究で用いた神奈川検体は大脳が自己融解していたが、ほぼ全ての臓器が採取することが出来た貴重な例である。

延髄は採取のし易いことや BSE 病原体を初

期から検出できることから、検査部位として最適であるが、本例に見る様に病原体の分布は延髄門部にかなり局限されて蓄積されている場合があるので検査の正確性を期するためにはサンプリング部位に十分な注意が払われねばならない。

BSE 病原体は中枢神経及び神経節にのみ局在するが、唯一、回腸のみが非神経組織として病原体を蓄積していた。本研究班の佐多は回腸において病原体が蓄積しているのはアウエルバッハ神経叢の神経細胞であることを免疫組織染色で明らかにしており、このことは経口接種された BSE 病原体が中枢神経に侵入する経路を明らかにする上で興味深い。

BSE はスクレーパーと異なり脾臓などのリンパ系組織には蓄積しないと考えられているが、本研究でもそのことを裏付けた。しかし、スクレーパーでは脾臓、扁桃等のリンパ系組織に PrP<sup>sc</sup> が蓄積することや vCJD で病原体が扁桃に検出されていることを考え合わせると、リンパ系組織についてはさらに検討を要するものと思われる。

## 8. 疑似患者を用いた発症前のプリオン動態

分担研究者 森 清一 北海道立畜産試験場畜産工学部長

**研究要旨** 牛海綿状脳症（BSE）疑似患者 18 頭の定期的な臨床症状の観察および血液、尿、脳脊髄液の採取を行い、異常な臨床症状を示す牛の確認、尿中異常プリオン蛋白の検出、脳脊髄液および血液の生化学項目の測定を行った。この結果、現在までのところ異常な症状あるいは測定値を示した個体は認められなかった。18 頭のうち 3 頭が死亡したが、異常プリオン蛋白の ELISA 検査結果は全頭陰性であった。

### A. 研究目的

と畜場における異常プリオン蛋白汚染のリスクを低減するため、また、わが国における BSE の早期清浄化を達成するため、農家段階でのスクリーニング検査による感染牛の摘発が必要である。そのため、疑似患者におけるプリオン動態およびその他の生化学的指標の変化を検討することにより、牛海綿状脳症の生前診断の可能性を探る。

### B. 研究方法

北海道猿払村および音別町の BSE 発生酪農家 2 戸から導入した BSE 疑似患者 18 頭（平成 7～9 年生まれ）を供試し、定期的な臨床症状の観察および血液、尿、脳脊髄液の採取を行い、後者についてプリオン蛋白の検出および生化学的診断指標項目の測定を行った。試料については一部を -80℃にて凍結保存した。なお、これらの牛は 7.5～8 歳を目途に殺処分する計画である。

#### 1. 疑似患者の導入およびその後の経過

〔平成 13 年〕

12 月 21 日 北海道猿払村の BSE 発生酪農家から疑似患者 15 頭（平成 7 年生まれ：2 頭、8 年生まれ：6 頭、9 年生まれ：7 頭）を導入。

〔平成 14 年〕

4 月 30 日 農林水産省より BSE に関する

学術研究機関の指定を受け、諸検査を開始。

5 月 28 日 音別町の BSE 発生酪農家から疑似患者 3 頭（平成 8 年生まれ）を導入。

11 月 21 日 疑似患者 15 頭全頭（3 頭死亡）を新牛舎に移動。

#### 2. 疑似患者の臨床症状観察および諸検査

##### 1) 臨床症状

以下に示した項目について詳細な観察を 2 か月毎に実施した。なお、異常な症状の有無については毎日の飼料給与作業時においても観察した。

##### ・神経症状

不安、興奮、神経過敏、歯ぎしり、耳の位置異常

##### ・姿勢・運動の異常

頭部を下げる、四肢の運動失調、震え、転倒、麻痺、横臥、旋回、飛節のナックル

##### ・知覚の異常

触覚、音に対する反応、耳の過剰な動き、光に対する反応

##### ・行動の異常

移動を嫌がる、鼻や腹を過剰に舐める、頭部を擦る

##### 2) 尿

2 か月毎に採取し、下記の項目を測定した。

・異常プリオン蛋白：ウエスタンブロットティング法

①試料調製

- a. 尿50mlを生理食塩水で2日間透析
- b. 20mlを10万G、1時間遠心
- c. 15  $\mu$ lにPK(1mg/ml)1  $\mu$ lを加え、37°C、30分間反応させる。
- d. Sample bufferを加え、40  $\mu$ lに調製。

②SDS-PAGE

Nu-PAGE System(Invitrogen)を使用。  
200V、50分間泳動。

③Western Blotting

Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cellを使用。膜はInvitrogenのPVDF膜を使用。Transferは100V、70分間で実施。

④抗体反応

- 1次抗体：6H4(Prionics) 5000倍、1時間反応
- 2次抗体：anti-mouse IgG(Amersham) 2500倍、1時間反応

⑤検出反応

ECL Western Blotting Analysis System (Amersham)を使用。X線フィルムに3分間露光。

3) 血液

2か月毎に採取し、下記の項目について測定した。

- ・赤血球分化関連因子 (EDRF)、CPK-BB
- ・タンパク二次元電気泳動
- ・一般生化学検査  
赤白血球数、Ht、Hb、血小板数、TP、Na、K、Cl、Glu、Ca、Mg、Ip、BUN、T-choI、Alb、GOT、ALP、 $\gamma$  GTP、CPK、NEFA、TG、 $\beta$ -OH、CREA

4) 脳脊髄液

4か月毎に採取し、下記の項目について測定した。

- ・異常プリオン蛋白、14-3-3蛋白、CPK-BB
- ・蛋白質、グルコース、クロール

3. 死亡牛の対応

1) 解剖

場内焼却場併設の解剖室において実施。

2) 異常プリオン蛋白の検査

延髄門部をサンプルとして ELISA 法により実施。

3) 臓器の保存

- ① 方法：凍結およびホルマリン
- ② 保存臓器：脳、脊髄、回腸遠位部、五大臓器、他。

4) 死体処理

保存臓器以外はすべて場内焼却場において焼却処分。

(倫理面への配慮)

サンプル採取および検査、死亡牛の剖検は、全牛の BSE 感染を前提として、細心の注意をはらって実施し、研究者の危険排除に努めた。また、脳脊髄液の採取は麻酔下で行うなど、牛が受ける苦痛を極力抑えるよう配慮した。

C. 研究結果

- 1) 期間中、いずれの牛においてもBSE感染を示唆する異常な臨床症状は認められなかった。
- 2) 期間中、いずれの牛においても尿中からの異常プリオン蛋白の検出は認められなかった。
- 3) 脳脊髄液中の蛋白、ブドウ糖、クロールは、期間中すべての牛が正常値の範囲で推移した。
- 4) 血液一般生化学項目は、CPKにおいて1頭で1回高値を示したが、それ以外はすべての牛が特に異常値を示すことなく推移した。
- 5) 死亡牛の解剖所見等は以下の通り。

(1) No.160 (猿払村)

- ・死亡年月日：平成14年4月22日
- ・死亡原因：第四胃右方変位
- ・解剖所見：  
第四胃右方変位
- ・異常プリオン蛋白検査結果：  
ELISA検査陰性

(2) No.172 (音別町)

- ・死亡年月日：平成14年7月21日
- ・死亡原因：心内膜炎
- ・解剖所見：  
胸水・腹水の高度貯留。心臓僧帽弁にカリフラワー状変化。
- ・異常プリオン蛋白検査結果：  
ELISA検査陰性

(3) No.150 (猿払村)

- ・死亡年月日：平成14年9月29日
- ・死亡原因：急性鼓脹症
- ・解剖所見：  
胸水・腹水軽度貯留、第一胃内ガス貯留、肺気腫、気管粘膜充血、気管内粘液貯留。
- ・異常プリオン蛋白検査結果：  
ELISA 検査陰性

#### D. 考 察

平成15年2月現在、死亡牛も含めて、疑似患畜牛のなかでBSE感染が疑われる個体は認められていないが、異常プリオン蛋白およびそれ以外の生前診断指標となる可能性のある項目について、今後も定期的に測定しながらBSE感染牛の発生をモニタリングしていく予定である。

本研究遂行のためには、BSE疑似患畜から感染牛の出現することが不可欠であるが、その確率は低いことが予想されることから、異常プリオン蛋白の実験感染（脳内接種）による効率的なBSE感染牛の作出について検討する必要がある。

#### E. 結 論

平成15年2月現在、死亡牛も含めて、疑似患畜牛のなかでBSE感染が疑われる個体は認められていない。