

9. キメラ型プリオンタンパク遺伝子導入によるプリオン感受性マウスの開発に関する研究

分担研究者 三好一郎 東北大学大学院医学系研究科助手

研究要旨 プリオン（異常感染型プリオンタンパク, PrP^{Sc}）に高い感受性を持つモデルを作製するために、キメラ型プリオンタンパク（PrP^C）遺伝子を導入しトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。ヒト/マウスキメラ型 PrP^Cを持つ Tg マウスは従来の報告例よりも高感受性で、有用なバイオアッセイ系としての可能性を示した。しかしながら、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 Tg マウスではその効果が見られず、異なる方法が必要と考えられた。

A. 研究目的

孤発性、あるいは医原性、家族性などのプリオン病が知られているが、近年、Bovine spongiform encephalopathy (BSE)及びそれに起因する可能性が示されつつある変異型 Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)、ヒト硬膜移植などで感染性のCJDが問題となっている。現実には、食品のみならず、ヒトやウシ由来の医薬品や化粧品などが利用されている。また、組換えタンパクを利用する場合も、用いられる培養系に動物由来成分が含まれている可能性が高い。これらはいずれも PrP^{Sc}で汚染されてはならないことから、微量検出系が必要である。一方、たとえ生化学的レベルで検出されたとしても、PrP^{Sc}の生物活性伝達性の検証が必要であり、潜伏期間の検討や病理学的な判定にはモデルを用いた動物実験が必須である。また、診断・治療法の開発および感染メカニズムの解明のためにもヒトあるいはウシ由来の PrP^{Sc}に高感受性のモデルマウスは重要である。今回、ヒトあるいはウシ、ヒツジとマウスのキメラ型 PrP^C 遺伝子を導入した Tg マウスを作製し、野生型マウスを用いた伝播実験に観察される、いわゆる種のバリアーを越えることが出来るか試みた。

B. 研究方法

まず、I/Ln マウスと 129SV マウスよりゲノ

ムクローニングを行った。I/Ln マウスゲノムより、プロモータ、エクソン1、イントロン1、エクソン2、イントロン2を含む12kbpの BamHI DNA断片を、129SV マウスゲノム由来のプロモータ上流の BamHI サイトの2kbp DNA断片とイントロン2の BamHI サイトの下流の6kbpのエクソン3を含む BamHI-SalI断片の間に挿入されるようにクローニングし、導入遺伝子の基本構造(約20kbp)とした。次に、129SV マウス由来のエクソン3の ORFの SmaI-BstEII をヒト PrP^C 遺伝子-コドン129 Met (ChM)とコドン129 Val (ChV)-に変え導入遺伝子とした。即ち、この導入遺伝子は、129SV マウス由来プロモータの下流に I/Ln マウス由来の5' 非翻訳領域(エクソン1、およびイントロン1、エクソン2、イントロン2を含む)、そして129SV マウス由来の ORFを含むエクソン3からなり、PrP^Cをコードする ORFは、シグナルペプチドを含むN-末端、および、GPIアンカーが結合するC-末端は129SV マウス由来のものを用い、その間にヒト由来 PrP^Cの配列が位置することになる。また、ウシ型およびヒツジ型キメラ PrP^C 導入遺伝子もヒト型に準じて構築した。

Tg マウスは、従来の方法に従い BDF1 マウス受精卵の前核に導入遺伝子をマイクロインジェクションすることにより作製した。得られた仔マウスの尾から抽出した DNA を用

いて、サザンブロットおよびPCR法にて、導入遺伝子の検出を行った。また、ウェスタンブロット法により発現しているPrP^Cを測定し野生型マウス内在性PrP^Cを1として相対的に比較した。

感染実験では、セボフルレンで吸入麻酔下、各々の1%脳乳剤20 μ lを脳内接種した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、東北大学大学院医学系研究科および九州大学大学院医学研究院、帯広畜産大学の動物実験指針に従って行われた。

C. 研究結果

ヒト/マウスキメラ型PrP^CTgマウスは、Tg-ChMが3系統、Tg-ChVが2系統確立された。各々の導入遺伝子由来PrP^C発現量は0.7x(Tg-ChM#30)および9x(Tg-ChM#59), 18x(Tg-ChM#69), 2x(Tg-ChV#12), 4x(Tg-ChV#21)であった。野生型マウスを用いてヒトCJD由来PrP^{Sc}の伝播実験を行った場合600から700日以上経過しても発症しないが、Tg-ChM#30マウスでは、野生型(内在性)PrP^Cを保持している場合(Tg+/- w/w)でも潜伏期間は382日程度に短縮された。さらにPrP^Cノックアウトマウス(PrP^{0/0})と交配することで作製されたマウスでは(Tg+/- w/0)215日、および(Tg+/- 0/0)156日、(Tg+/+ 0/0)147日と、内在性マウスPrP^Cの発現量の減少と、導入遺伝子由来ヒト/マウスキメラ型PrP^Cの発現量の増加に伴って潜伏期間は短縮し、感受性が向上した。この傾向はTg-ChV#12あるいはTg-ChV#21でも同様で、全例で発症し、マウス由来PrP^{Sc}を野生型マウスに接種する同種間の伝播実験で観察される潜伏期間の120日にかなり匹敵するものであった。また、この3系統(遺伝子型はいずれもTg+/- 0/0)で由来の異なるPrP^{Sc}を用いた伝播実験では、孤発性CJDの場合が154~156日(Tg-ChM#30)あるいは171~175日(Tg-ChV#12), 188~192日(Tg-ChV#21), 一方医原性CJDは189日(Tg-ChV#12), さらに家族性CJDは179日(Tg-ChM#30), 220日(Tg-ChV#12)であった。いずれも、全例で発症し、従来報告されているものと同じかそれよ

りも短縮された潜伏期間を示し感受性の上昇が認められた。

同じプロモータを用いてマウスPrP^Cを発現させたTgマウスにマウス由来PrP^{Sc}を接種して行った対照実験では、マウスPrP^Cの発現量が1x→1.1x→2xと増加にすることで潜伏期間は逆に163日→154日→107日と短縮したが、Tg-ChMおよびTg-ChVの場合は、潜伏期間の長さがヒト/マウスキメラ型PrP^Cの発現量に依存しなかった。それどころか期待に反して、PrP^Cの発現量が非常に多い系統(Tg-ChM#59及びTg-ChM#69)は潜伏期間の延長(250日以上)を示した。

同様にウシ/マウスキメラ型PrP^CTgマウスは3系統が、またヒツジ/マウスキメラ型PrP^CTgマウスは4系統が確立された。各々の導入遺伝子由来PrP^C発現量は0.8x(Bo/Mo#10)および0.5x(Bo/Mo#43), 2.3x(Bo/Mo#46), また、1x(Sh/Mo#4)および1.1x(Sh/Mo#20), 0.3x(Sh/Mo#50), 0.3x(Sh/Mo#61)であった。内在性マウスPrP^Cを保持したままの遺伝的背景で2種のscrapie由来PrP^{Sc}に対する感受性を調べたところ、コントロールの野生型マウス(542および470日)に比較して僅かな感受性の向上が見られた場合もあったが、ヒト/マウスキメラ型PrP^CTgマウスと異なり、導入遺伝子の発現によって全例が発症するものの潜伏期間は逆に延長した(505~701日および493~657日)。また、PrP^{0/0}マウスと交配することで作出された内在性マウスPrP^Cを持たない系統も、逆に内在性マウスPrP^Cを持つ系統よりも長い潜伏期間を示しただけでなく発症率の低下が観察された。

症状の程度や経過は個体や系統によって異なるが、導入遺伝子に用いたPrP^C遺伝子の由来動物種に関わらず、高発現のTgマウスは歩行異常や消瘦などの類似症状を示した。最も激しいを示したヒツジ/マウスキメラ型PrP^CTgマウスは、4週目から顕著な成長遅延が観察され、7~8週目には歩行異常及び下半身の消瘦が進行し、9~10週目には後肢が麻痺した。病理学的には、筋繊維間の線維化や筋繊維の壊死は見られないが、主に赤筋の萎縮が顕著で、筋繊維の

直径の低下が著明であった。

D. 考 察

短絡的に考えると種のバリアーを越え PrP^{Sc} に感受性を持つためには PrP^{Sc} と同じ種の PrP^C 遺伝子を導入してやればよい。しかし、マウスの体内でゲノムから転写翻訳され GPI アンカー型の膜タンパクに至るプロセスやその局在性はマウス内在性 PrP^C と同じでなければならない。また、導入遺伝子の発現はマウスの内在性 PrP^C と同じ組織特異性を要する。さらに、接種された PrP^{Sc} を鋳型にして PrP^C が構造変換する際、発現している PrP^C の濃度が反応速度を規定する可能性がある。一方、PrP^C → PrP^{Sc} の構造変換にはそれら自身の他に未知の因子が必要なことも示唆されている。この因子と相互作用する部位が PrP の 2 つのアイソフォームに存在する筈である。

以上の要因を念頭に Tg マウス作製に用いた導入遺伝子の構造は、翻訳後の PrP^C の N-末端、および C-末端はマウス由来であるため、マウス内在性の PrP^C と同様にプロセッシングを受けシグナルペプチドの除去や GPI アンカーリング等の修飾を受けることが出来、局在性も相同と期待できる。また、プロモータ領域も 5'末端側領域をかなり上流まで含みゲノムに近い形態を保持することから内在性の転写制御に近いものが得られることを期待される。例えばヒト/マウスキメラ型の発現される成熟型 PrP^C は、多型を考慮してコドン 129 を Met あるいは Val にしてあることを除けば、全く同じヒト/マウスキメラ型 (コドン 23~188 がヒト PrP^C, 189~231 がマウス PrP^C) である。Tg マウスは内在性に非常に近いと想定されるプロモータ領域遺伝子の発現制御下、発現量は系統によって異なる。今回我々が用いたプロモータは、特定の組織を除いては、内在性プロモータとほぼ同様の組織・時期特異性を示し、また、導入コピー数に依存して遺伝子を発現するなど、プリオン感受性 Tg マウス作製に非常に有効であった。

今回調べたヒト/マウスキメラ型 PrP^C Tg マウスは、孤発性及び医原性、家族性など様々な

CJD由来 PrP^{Sc} 接種により全例発症するだけでなく過去に報告されたヒト型あるいはヒト/マウスキメラ型 PrP^C 発現 Tg マウス (PrP^{0/0}) よりも短い潜伏期間を示す高感受性モデルであった。いずれの Tg マウスも従来報告されたヒト型と異なり内在性 PrP^C が存在しても CJD 由来 PrP^{Sc} に感受性を示したが、内在性 PrP^C の無い PrP^{0/0} 背景の方が遙かに高い感受性を持つ様になった。この現象はコドン 94~188 をヒト型に置換したヒト/マウスキメラ型 PrP^C 発現 Tg マウスに観察された報告と同様であったが、潜伏期間の点では我々の 3 系統の方が短く高感受性であった。しかしながら、その発現量に依存して潜伏期間が短縮する野生型 PrP^C Tg マウスの場合と異なり、キメラ型は発現量の増加は却って感受性の低下を招いた。また、過去の報告と合わせると、ヒト/マウスキメラ型 PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換に際しマウス PrP^C 由来の C-末端が重要な機能を担っていることが示唆された。

一方、ウシ/マウスキメラ型 PrP^C Tg あるいはヒツジ/マウスキメラ型 PrP^C Tg マウスは scrapie 由来 PrP^{Sc} に対して感受性が上昇するどころか逆に低下し、導入遺伝子自身が無効であると考えられた。特に、内在性 PrP^C の無い PrP^{0/0} 背景では潜伏期間が延長するだけでなく発症率も低下することから発現したキメラ型 PrP^C が PrP^{Sc} へ構造変換する効率はマウス野生型 PrP^C よりも低いことが明らかになった。

正常な PrP^C の過剰 (高) 発現により筋病変を示す Tg マウス系統は、神経原性かあるいは筋原性か不明である。紛らわしい症状を伴うため伝播実験には好都合ではないが、PrP^C の機能解析に有効なモデルであるかもしれない。

E. 結 論

ヒト/マウスキメラ型 PrP^C 遺伝子を導入した Tg マウスは、ヒト CJD 由来 PrP^{Sc} に高い感受性を示し、有用なバイオアッセイ系としての可能性を示した。しかし、その感受性は PrP^C の発現量に依存せず、高発現が逆に抵抗性を伴う傾向を示した。一方、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 Tg マウスは、野生型マウスと比較しても

scrapie 由来 PrP^{Sc} に対する感受性が低く, 高感受性を示すマウスを作製するためには新たな方法が必要と考えられた。

以上は, 東北大学・北本哲之教授, および九州大学・毛利資郎教授, 帯広畜産大学・堀内基広・石黒直隆両助教授, 動衛研プリオン病センター品川森一センター長との共同研究である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirabayashi, M., Kato, M., Aoto, T., Sekimoto, A., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N., Hochi, S.: Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Res.*, 11, 221-228, 2002.
- 2) Kitamoto, T., Mohri, S., Ironside, J.M., Miyoshi, I., Tanaka, T., Kitamoto, N., Itohara, S., Kasai, N., Katsuki, M., Higuchi, J., Muramoto, T., Shin, R.-W.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294(2), 280-286, 2002.
- 3) Sueta, T., Miyoshi, I., Okamura, T., Kasai, N.: Experimental eradication of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) from mice colonies using Ivermectin. *Exp. Anim.*, 51 (4), 367-373, 2002.
- 4) Miyoshi, I., Takahashi, K., Kon, Y., Okamura, T., Mototani, Y., Araki, Y., Kasai, N.: A mouse transgenic for murine oviduct-specific glycoprotein promoter-driven simian virus 40 large T-antigen: Tumor formation and its hormonal regulation. *Mol. Reprod. Dev.*, 63(2), 168-176, 2002.
- 5) Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Miyoshi, I., Mohri, S., Takata, M.: Susceptibility of transgenic mice expressing chimeric sheep, bovine and human PrP genes to sheep scrapie. *J. Vet. Med. Sci.*, in press.
- 6) Sato, Y., Terada, Y., Utsunomiya, H., Koyanagi, Y., Miyoshi, I., Sasano, H., Murakami, T., Yaegashi, N., Okamura, K.: Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of human ovarian cortex into NOD-SCID mice. *Mol. Reprod. Dev.*, in press.
- 7) Murakami, M., Miyoshi, I., Suzuki, T., Sasano, H., Iijima, T.: Structures of the murine genes for the $\beta 1$ and $\beta 4$ subunits of the voltage-dependent calcium channel. *J. Mol. Neurosci.*, in press.
- 8) Okamura, T., Miyoshi, I., Takahashi, K., Mototani, Y., Ishigaki, S., Kon, Y., Kasai, N.: Bilateral congenital cataracts result from a gain-of-function mutation in the gene for aquaporin-0 in mice. *Genomics*, in press.

10. 高感度バイオアッセイ系の開発

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部室長

研究要旨 安定したウシ異常プリオン蛋白の作製と供給、BSEの発症機構、病理解析、薬剤スクリーニング、さらに感染価測定、診断系のためのバイオアッセイ系確立を目的として、ウシプリオン単独発現マウスの作成を開始した。今年度は、ウシプリオン遺伝子導入マウスファウンダー3匹を作出し、少なくとも1系統において脳でのmRNA発現を確認することが出来た。

A. 研究目的

2001年にウシ海綿状脳症（BSE）の日本での初発例が確認され、食の安全性に対する大きな社会的問題を引き起こした。これに対応して、現在では、公衆衛生的見地からの高度な安全対策が整ってきた。しかしながら、BSE病原体である異常プリオンタンパク質が正常型からどのようにして形成されるのか、またウシ海綿状脳症の感染・発症機構については不明の点が多く、科学的な解明が必要であり、これらの研究のためには、とくに実験動物を用いた感染実験系およびバイオアッセイ系が必須である。本研究では、プリオンノックアウトマウスを使用してトランスジェニックによりウシプリオン単独発現マウスを作成し、BSE乳剤を接種し、安定した（株化）ウシ異常プリオン蛋白の作製と供給、BSEの発症機構、病理解析、薬剤スクリーニング、さらに感染価測定、診断系のためのバイオアッセイ系確立を目的とする。

B. 研究方法

1) ウシプリオン発現トランスジェニックマウス作成と解析

ウシプリオン遺伝子（ORF、264アミノ酸をコード）は、ホルスタイン種ウシゲノムDNAからPCRクローニングにより得た。強発現用プロモーターとしてニワトリ β -galアクチンプロモーター（CAGプロモーター）を用い、ウシプリオン遺伝子（ORF）との融合遺伝子を構築し、必要なトランスジェニックDNA断片（3.2kbp）を精製した。トランスジェニックそのものがウシ

プリオン蛋白を発現することは、培養細胞へのトランスフェクションによりウエスタン解析により確認した（感染研高橋秀宗先生との共同研究）。トランスジェニックDNAをC57BL/6マウスの受精卵にマイクロインジェクションしてトランスジェニックマウスを作成した。マウスゲノムにトランスジェニックが挿入されたかは、導入トランスジェニックに特異的な配列4箇所について、PCR法にて増幅し確認した。トランスジェニックマウスのウシプリオンmRNAの発現解析は、脳よりRNAを抽出し特異的なプライマーセット4種類を用いRT-PCRにより行った。

2) プリオン研究用マウスのクリーニングと感染研への導入

プリオンノックアウトマウス $Prnp^{-/-}$ （C57BL/6 congenic系）は、理研（糸原重美先生）より凍結胚（ヘテロと野生型を含む）を分与され、融解胚を偽妊娠マウスへ移植することにより微生物学的なクリーニングを行った。 $Prnp^{-/-}$ を遺伝的背景に持つシロオリックスプリオン蛋白遺伝子導入マウス $Tg(OryxPrp)/Prnp^{-/-}$ は東大（小野寺節先生）より妊娠雌を導入し、卵管より2細胞期胚を採取し、偽妊娠マウスに胚移植しクリーニングを行った。

（倫理面への配慮）

実験動物については、実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行う。異常型プリオンの取り扱い及びマウスへの感染は国立感

感染症研究所におけるバイオセフティー安全規程を遵守し、国際的な基準にも十分に配慮する。

C. 研究結果

1) ウシプリオン発現トランスジェニックマウス作成と解析

ウシプリオン遺伝子を注入した胚由来の産仔が 164 匹得られ、そのうち 3 匹で 4 種類のプライマー全てで陽性であり、トランスジーンの全長が挿入されていると考えられた。別の 1 匹については、3 種類のプライマーで陽性、1 種類のプライマーで陰性と判定され、プロモーター領域が欠損しているものと考えられた。全長が挿入されている 3 匹のトランスジェニックファウンダーについて、C57BL/6 マウスとの交配により F1 世代を作出した。調べた 1 ラインについては F1 世代へのトランスジーンの伝達を確認しており、脳におけるトランスジーン由来 mRNA の発現が RT-PCR によって認められた。

2) プリオン研究用マウスのクリーニングと感染研への導入

プリオンノックアウトマウスに付いては、凍結 2 細胞期胚 40 個を融解回収し、26 個の正常胚を 1 匹の偽妊娠雌に移植し、9 匹の産仔を得た。このうち 3 匹がヘテロノックアウトであることが PCR により判定され、現在、ヘテロ同士の交配を行っている。Tg(OryxPrp)/Pmp^{-/-}に付いては、6 匹の妊娠雌から 2 細胞期胚 133 個を採取し、5 匹の偽妊娠雌に移植し、40 匹の産仔を得、37 匹が Tg(OryxPrp)/Pmp^{-/-} (但しトランスジーンに関しては、ヘミ、ホモを含む) であり、3 匹がトランスジーンを含まないプリオンノックアウトマウス Pmp^{-/-}で有ることを PCR により判定した。

D. 考察

ウシプリオン遺伝子導入マウスファウンダーが 3 匹得られ、今までに 1 系統において脳での mRNA 発現を確認することが出来た。今後、ノーザン解析、ウェスタン解析等により

詳細な発現パターンを検討する予定である。また、プリオンノックアウトマウスとの交配を開始しており、ウシプリオン単独発現マウスの樹立が待たれる。BSE 乳剤のモデルマウスへの接種では、ウシプリオンが多く発現している程、発症時期が早まると考えられており、より多発現のモデルマウスの樹立のためには、複数ラインのトランスジェニックマウスの組合せによる transgene dosage の増大が有効と考えられる。今年度は、強発現系の作出を目指したので、CAG プロモーターを用いたが、今後、各種プロモーター (プリオンプロモーター、神経特異的プロモーター等) をもちいた新たなトランスジェニックマウスの作出も有効かも知れない。その他、今年度は、プリオンノックアウトマウス (C57BL/6 congenic 系) とシロオリックスプリオン蛋白遺伝子導入マウスのクリーニングと感染研への導入を胚移植により効果的に行うことが出来た。今後、モデルマウスが樹立されれば、BSE 乳剤を接種し発症経過を観察するとともに、発症個体の病理学的検索、牛異常プリオン蛋白の同定を行う予定である。さらに潜伏期間の短い TG マウス系統を用い、各種の BSE 乳剤を接種し、牛異常プリオンの安定した供給源となるか、また薬剤スクリーニング型、感染価測定、診断系のための高感度バイオアッセイ系として利用できるかどうかを検討する。

E. 結論

安定したウシ異常プリオン蛋白の作製と供給、BSE の発症機構、病理解析、薬剤スクリーニング、さらに感染価測定、診断系のためのバイオアッセイ系確立を目的として、ウシプリオン単独発現マウスの作成を開始した。今年度は、ウシプリオン遺伝子導入マウスファウンダー 3 匹を作出し、少なくとも 1 系統において脳での mRNA 発現を確認することが出来、現在プリオンノックアウトマウスとの交配を行っている。今後、本マウスモデルが高感度バイオアッセイ系として利用できるかどうかを検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J.: Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64:219-225.
- 2) Higuchi T, Aiba Y, Nomura T, Matsuda J, Mochida K, Suzuki M, Kikutani H, Honjo T, Nishioka K, Tsubata T.: Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J Immunol*, 2002, 168:9-12.
- 3) Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A.: Comparison of glycoprotein hormone α -subunits of laboratory animals. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62:335-42.

2. 学会発表

- 1) 徐聖旭、神山恒夫、佐多徹太郎、松田潤一郎、山田章雄、桑原正貴、局博一、遠藤秀紀、糸原重美、佐伯圭一、松本芳嗣、小野寺節： シロオリックス PrP 遺伝子を有する Tg マウスにおけるプリオン高感受性及び過発現による心臓異常、日本神経ウイルス学会、2002年7月、三島。

1 1. カニクイザルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発

分担研究者 寺尾恵治 国立感染研筑波霊長類センター

研究要旨 カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 感染モデルを作成し、変異型 CJD の病態解明および早期診断法を確立するとともに、BSE-P 接種後継時的に採取した血液、髄液、主要組織を研究班共通の研究資源とすることを目的として、今年度は以下の設備整備と実験準備を実施した。

BSE-P 接種動物は P3 実験区内管理になることから、動物福祉に配慮してサルのための社会的コミュニケーションを可能にし、行動・高次脳機能評価が可能な改良型アイソレータケージを作成した。リスザルのスクレイピ・プリオンの脳内接種実験の臨床経過をもとにして、継時的に調査すべき項目と調査スケジュールを決定した。非侵襲的な神経機能検査として、大脳皮質電位、誘発電位感覚系 (感覚系上行路)、誘発電位運動系 (下行路) の測定法を確立した。高次脳機能評価法として、指迷路試験を用いた記憶能の評価を試み、長期記憶の評価が可能であることを実証した。これにより、カニクイザルを用いた BSE-P 接種実験の準備を完了した。

キーワード：カニクイザル、BSE、変異型 CJD、高次脳機能評価

A. 研究目的

カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 感染モデルを作成し、変異型 CJD の病態解明および早期診断法を確立することにより将来の治療研究に資することを最終目的とする。あわせて、BSE-P 接種後継時的に採取した血液、髄液、主要組織を研究班共通の研究資源とすることも目的とする。BSE-P 接種動物は P3 施設内で比較的長期間管理する必要があることから、今年度は動物福祉に配慮した P3 飼育環境を整備することを目的とした。また、これまでに実施したスクレイピ・プリオン接種実験の臨床経過を参考にして、実験スケジュール及び調査項目を決定するとともに、新規の神経機能評価法および高次脳機能評価法を確立することも今年度の目的とした。

B. 研究方法

1. 動物福祉に配慮した P3 アイソレータケージの改良：

サル類は社会的動物であることを考慮して、視覚、聴覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするアイソレータケージを改良した。

2. 調査項目実験スケジュール：

リスザルへのスクレイピ・プリオン接種実験での臨床経過を参考にして、BSE-P 接種実験の実験スケジュールおよび調査項目を以下のように決定した。

A) 実験方法と実験区供試動物数

接種材料：BSE ウシ脳乳剤

供試動物：霊長類センターで繁殖育成した
1 歳齢の雄カニクイザル 12 頭

接種方法：	脳内接種	2 頭
	経口投与	6 頭
	腹腔内投与	2 頭
	コントロール	2 頭

B) 調査項目：

定期的に調査・採材する項目

1) 行動解析

指定行動観察・ビデオ撮影

指迷路試験 (高次脳機能評価)

アップルテスト (行動評価)

2) 神経機能解析

大脳皮質脳波

視覚、聴覚、体性感覚誘発電位

磁気刺激筋電図

3) 定期的採材項目

血液、尿、糞、髄液、骨髄

BSE-P 接種後、6、12、24 ヶ月目にそれぞれ 1 頭を安楽殺し、剖検及び病理解析に供す。剖検時に採材した組織は研究班共通の研究資源として確保する。

3. 指迷路試験：

高次脳機能の内、長期記憶の評価を簡便におこなう装置であり、4 段の指迷路装置内に置かれた報酬を順をおって移動させ、最終的に取りだし口から獲得する方法を学習させることができる。習得訓練として、15 試行/セッションとし、2 セッション/日、4 もしくは 5 日/週のスケジュールで実施した。装置餌箱からの報酬確保を学習させた後、1 段目から順に試行を繰り返して、報酬獲得法を学習させる。各段の習得基準は 15 試行中 14 試行以上の正解が 2 セッション続くこととした。4 段目の習得基準に達した 1 ヶ月後に、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテストを 2 日実施し、長期記憶の評価とした。

4. アップルテスト：

手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレー上に等間隔で置かれた 4 個の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し、画像解析により行動異常を評価した。

5. 体性感覚誘発電位：

リスザルにおけるスクレイピー感染実験時で異常のみられた視覚及び聴覚誘発電位に加えて、手指の行動と対応する体性感覚誘発電位の測定を行うこととした。体性感覚誘発電位は正中神経手根部に電気刺激を行うことにより発生する、脊髄および大脳感覚野の誘発脳波を測定する。

6. 磁気刺激誘発筋電図：

vCJD の早期診断法として、大脳からの下行路の異常を診断するために、大脳皮質の一次運動野に磁気刺激を加えることにより発生する

前腕部の筋電図の測定する。磁気刺激は磁場をつくるとその中の神経線維には電流が発生し、活動電位が発生することになる。

C. 研究結果および考察

図 1 に改良型 P3 アイソレータケージを従来型ケージと比較した図をしめす。改良型アイソレータの特徴は、ケージスペースを拡大し、ケージ上部に照明を設置してケージ内の照度を高めたことにより、飼育環境の改良ができた。さらに、アイソレータ内に 2 台のケージを設置し、側面をアクリル板にしたことで、隣り合った 2 頭が、視覚および聴覚を通じて社会的コミュニケーションがとれることから、社会的動物としてのサルの特性に配慮した環境エンリッチメントが実現できた。さらに、前部ドアを改良し、行動及び高次脳機能評価のための装置が簡単に装着でき、P3 内での行動観察を可能にした。従来型のアイソレータケージに比べて、動物福祉と環境エンリッチメントの観点から利点の多いケージといえる。本実験のように比較的長期間の飼育管理が必要な実験では、飼育環境の改善は重要な要因となる。

今回の実験のスケジュールおよび調査項目の決定にあたって参考としたリスザルへのスクレイピー接種実験の臨床経過を表 1 に示す。スクレイピー因子の初代接種では発症までの潜伏期が 36 - 63 ヶ月であり、発症を行動異常、神経症状、脳波異常で判定することが可能であった。そこで、今回の BSE-P 接種実験では、定期的に採材した動物由来材料からの BSE-P の検出と平行して、継時的に行動および高次脳機能を調査するとともに脳波等の神経機能測定し、早期診断に有効な項目の選択を試みることにした。接種動物由来材料は、1 - 3 ヶ月ごとに採材される血液、尿、糞、咽頭拭い液、髄液、骨髄に加え、半年ごとに実施する安楽殺後の主要臓器も研究資源として確保する。

今回調査対象とした高次脳機能は長期記憶の評価であるが、指迷路装置を用いたこれまでの実験は主として指迷路の攻略戦略の学習能力を評価するものであり、長期記憶を評価したこ

とはなかった。そこで今回指迷路装置を使って長期記憶の評価が可能か否かを検討した。BSE-P 接種実験に使用予定の 12 頭のカニクイザルの内、習得訓練が終了した 8 頭について、習得訓練 1 ヶ月後にランダムテストをおこない、1 ヶ月後の記憶を評価した。図 3 にその結果を示す。図左にそれぞれの個体で習得訓練の各段階で基準達成までに要した試行数を示す。図に示すように習得訓練ではそれぞれの段階、特に第二段、で基準達成までに要した試行数に大きな個体差が見られる。学習能評価ではこの段階での個体差を問題とするが、今回は習得した記憶の保持を評価することが目的であるので、1 ヶ月後のランダムテストでの正解率が問題となる。図右に各個体の 1 ヶ月後のランダムテストの成績を示す。習得段階で試行数に大きな違いが見られたのに関わらず、ランダムテストではいずれの個体も 80% 以上の正解率を示した。このことから、指迷路装置を用いたランダムテストにより長期記憶の評価が可能と判断した。

リスザルへのスクレイピー接種実験では、行動異常が認められた時期から、背景脳波の平坦化、多発性棘波、聴覚脳幹部誘発電位 (ABR) および視覚誘発電位 (VEP) の異常が観察されている。今回の実験では、これらの神経機能測定に加えて体性感覚誘発電位及び、磁気刺激誘発電位の測定をおこなうことにし、測定法を確立した。これは感覚系の上行路と下行路とを同時にモニターすることにより、アップルテストで評価される手指の行動機能傷害と神経機能障害の両面からモニターすることにより、発症の早期診断および vCJD の病態発現解明に資することを目的としたものである。

今年度は主としてカニクイザルを用いた BSE-P 接種実験のセットアップをおこなった。その結果、P3 施設飼育環境のエンリッチメントに寄与するケージの作成、調査項目およびスケジュールの決定、調査項目の有用性の評価を終えることができ、接種実験を開始する準備が整った。

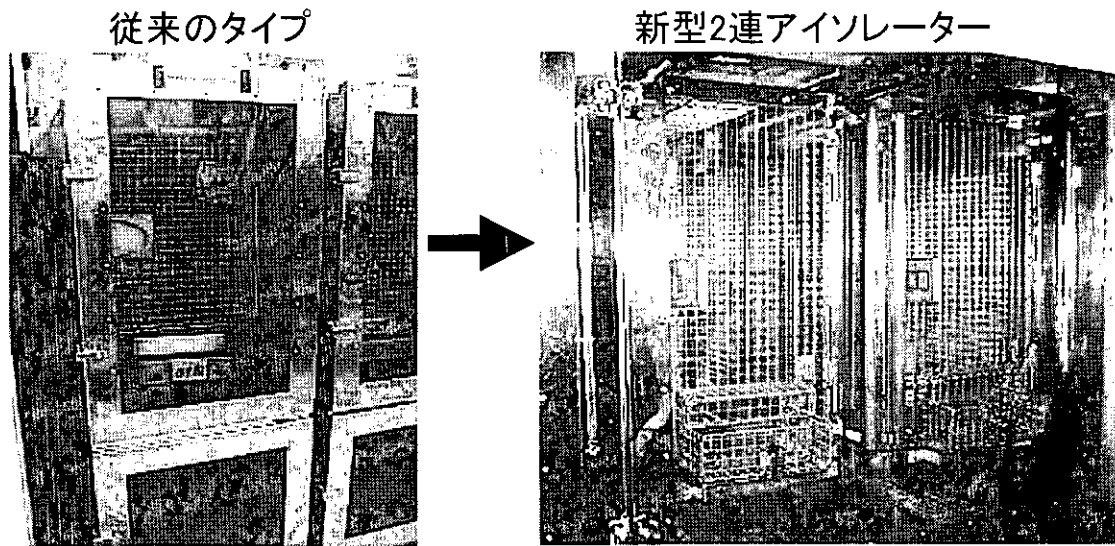
D. 結 論

カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 接種実験を開始するための準備をおこなった。動物福祉に配慮してサルのための社会的コミュニケーションを可能にし、行動・高次脳機能評価が可能な改良型アイソレータケージを作成した。リスザルのスクレイピー・プリオンの脳内接種実験の臨床経過をもとにして、継時的に調査すべき項目と調査スケジュールを決定した。非侵襲的な神経機能検査として、大脳皮質電位、誘発電位感覚系 (感覚系上行路)、誘発電位運動系 (下行路) の測定法を確立した。高次脳機能評価法として、指迷路試験を用いた記憶能の評価を試み、長期記憶の評価が可能であることを実証した。これにより、カニクイザルを用いた BSE-P 接種実験の準備を完了した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tutida J, Kawasaki K, Sankai T, Kubo N, Terao K, Koyama T, Makino J, and Yoshikawa Y, New type of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis*. Int. Primatol., 2003, in press.



特徴

- ケージの大型化と2台のケージの連結により、視覚、聴覚での社会的コミュニケーションを可能にした。
- ケージ上部に照明を設置し、アイソレーター内の十分な照度の維持を可能にした。
- 全面扉を透明板と交換することにより、行動観察を容易にした。
- えさ箱と行動実験用ツール(指迷路装置、アップルテスト装置)の交換を容易にした。

図1: 改良型P3アイソレーターケージ

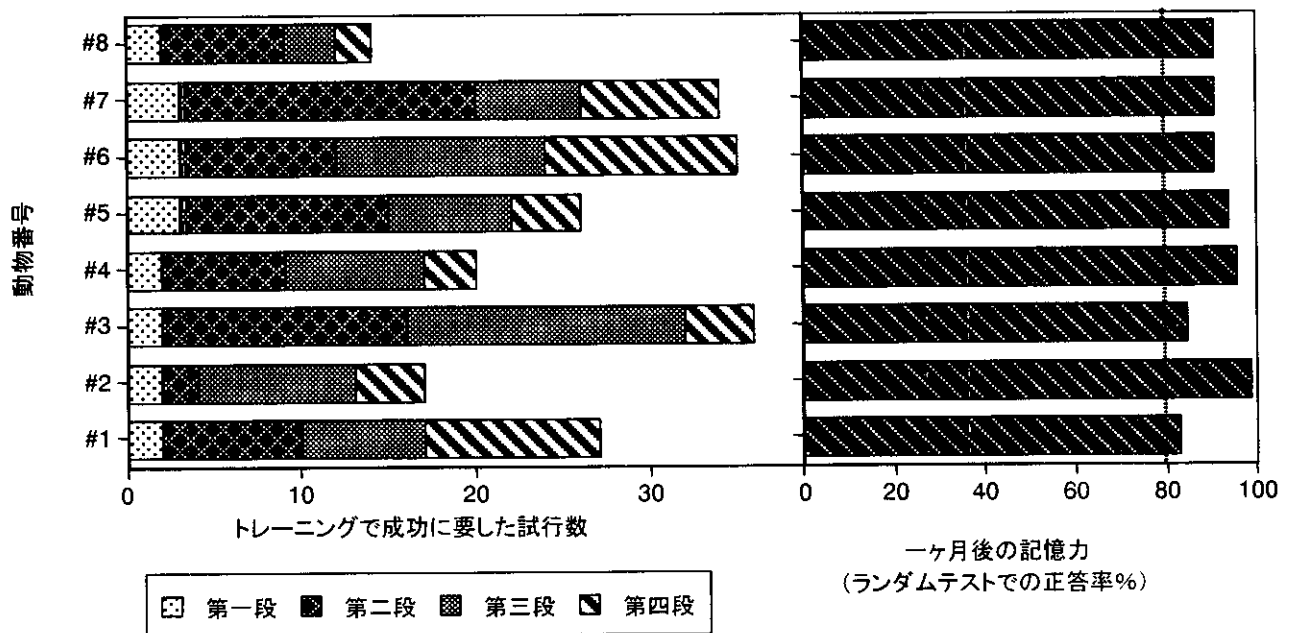


図2: 指迷路試験によるカニクイザルの記憶力評価

表1:リスザルを用いたスクレーピー伝播実験での臨床経過

動物番号	接種材料	潜伏期 (月)	行動異常	神経症状	脳波異常	病変
#S1	ヒツジ→ ヒツジ	52	±	+	+	+
#S2	ヒツジ→ ヒツジ	63	±	-	±	-
#S3	ヒツジ→ マウス	36	+	+	+	+
#S4	ヒツジ→ マウス	42	+	+	+	+
#S5	#S3 リスザル	22	+	+		+
#S6	#S3 リスザル	30	+	+		+

1 2. 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

研究協力者 横島敏夫 高橋德行 秋山雅彦（神奈川県食肉衛生検査所）

研究要旨 牛海綿状脳症（BSE）の国内発生に伴い、BSEと変異型クロイツフェルト・ヤコブ病との関連性がクローズアップされ、牛のと畜・解体処理における脳・脊髄組織による食肉等への汚染が問題となり、BSEスクリーニング全頭数検査に併せ、背割り前の脊髄除去等の安全対策が講じられている。しかしながら、牛のと畜・解体方法によっては、特定部位である脳・脊髄組織が血液を介して心臓、肝臓等の臓器又は筋肉中に移行する可能性があるとの指摘もあることから、さらなる安全確保の観点から、国内におけるスタニング及びピッシングと血液中の脳・脊髄組織汚染の関連について調査検証する。併せて、食肉の神経組織汚染のモニタリング方法の適否についても検証する。

A. 研究目的

欧州委員会科学運営委員会報告書（2001年9月）によると、牛の頭蓋骨に孔をあけて気絶させる「スタニング」及びと体の不動化のためにワイヤーで脳脊髄を破壊する「ピッシング」を実施した場合、破壊された脳・脊髄組織が血液の循環とともに心臓、肝臓等の臓器又は筋肉中に移行する可能性があることから、現在のスタニング及びピッシング処理のあり方に改善を求める内容になっている。

我が国では、諸外国に例をみない「BSEスクリーニング全頭数検査」が導入され、併せて特定部位（SRM）の除去等の安全確保対策が実施されている。

しかしながら、我が国においては、牛のと畜・解体において、ボルトピストルを用いたスタニング及びワイヤーを用いたピッシングを実施している施設が大半を占めることから、国内におけるスタニング及びピッシングの実施と血液中の脳・脊髄組織汚染の関連について、現行法で調査検証するとともに、その結果を踏まえ、食肉等への神経組織汚染防止方法を調査研究する。

調査研究に当たっては、一定の統計処理が可能となるデータを得るため、全国食肉衛生検査所協議会の会員に協力を求めて実施する。

枝肉外側の表面については、前回の調査（平

成13年度厚生科学特別研究事業（牛海綿状脳症（BSE）に関する研究）分担研究報告）により脳・脊髄組織の付着は認められなかったが、脊椎に付着している食肉については、と畜・解体時の脊髄除去工程、背割り工程及び枝肉洗浄工程において椎間孔からの脊髄組織汚染が考えられることから、前肢及び後肢へ太い神経が走っている脊髄頸膨大部及び腰膨大部の脊椎外側の食肉について脳・脊髄組織による汚染状況を調査し、その結果を踏まえ、食肉等への汚染防止方法を研究開発する。

併せて、食肉の神経組織汚染のモニタリング方法の適否についても検証する。

B. 研究方法

1. スタニング及びピッシングに起因する血液を介した脳・脊髄組織汚染調査

ピッシング実施機関

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、大阪府松原食肉衛生検査所及び神奈川県食肉衛生検査所

ピッシング非実施機関

青森県田舎館食肉衛生検査所、群馬県中央食肉衛生検査所、長野県上田食肉衛生検査所、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

脳・脊髄組織検出試薬

RIDAスクリーン脳・脊髄組織含有テスト（生肉／拭取り・定量用）（R-biophar社製）（以下「キット」という。）を使用した。

このキットは、脊髄等の中枢神経系組織中に主に含有され、血液及び筋肉中には含まれないとされるグリア繊維細胞酸性タンパク質（以下「GFAP」という。）をサンドイッチELISA法により検出する。

キット中には以下の器具・試薬等を含む。

- ・マイクロタイタープレート
8ウェル×12列 GFAP抗体が固相化されている。
- ・標準溶液4種
0、0.1、0.2、0.4%（%は肉中換算濃度）
- ・酵素複合体
抗GFAP抗体・ペルオキシダーゼ複合体溶液
- ・試料希釈バッファー
用時10倍希釈。SDS0.5%を含有するリン酸緩衝液
- ・洗浄バッファー
蒸留水1Lに溶解する。
Tween20 0.05%を含有するリン酸緩衝液
- ・基質／発色液
テトラメチルベンジジン含有
- ・反応停止液 1N硫酸

調査対象

検体数は各検査所20頭（神奈川県22頭、青森県田舎館19頭、千葉県東総40頭）とし、合計223頭（ピッシング実施機関122頭、ピッシング非実施機関101頭。延669検体）について、と殺前の生前血、と殺時の放血及び心残血を採取し調査した。

また、上記健康畜とは別に、病畜と室で処理される牛85頭（ピッシング非実施。延255検体）についても同様に調査した。

実施方法

- ・血液採取

牛の生体検査時の生前血（頸静脈又は尾静脈）、と殺時の放血及び心残血（右心室）約5mlをヘパリン加小試験管に採取した。一時的に保存する場合は-20℃以下で保存した。

・材料調製

採取した血液をキット付属の希釈バッファーで20倍に希釈した（血液50µl：希釈バッファー950µl）。

・ELISA

キットを使用し、次の手順で実施した。

- ①調製試料、各標準液を50µlずつ各ウェルに滴下する。
- ②各ウェルに酵素複合体液を50µlずつ滴下し、振とうする。（最初の滴下と最終の滴下の間は1分以内とする（1回の検査で24検体～32検体まで。以下同様。）
- ③室温で30分間インキュベーション後、ウェル内の液を除去し、洗浄バッファー300µlで5回洗浄する。
- ④各ウェルに基質／発色液を100µlずつ滴下し、振とうする。
- ⑤暗箱内にて室温で5分間インキュベーション後、各ウェルに反応停止液を100µlずつ滴下し、主波長450nm、副波長620nmで吸光度を測定する。

2. 脊椎外側部に付着する食肉中の脳・脊髄組織汚染調査

実施機関

青森県田舎館食肉衛生検査所、群馬県北部食肉衛生検査所、群馬県中央食肉衛生検査所、埼玉中央食肉衛生検査センター、千葉県東総食肉衛生検査所、長野県上田食肉衛生検査所、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

脳・脊髄組織検出試薬

血液と同様のキットを使用した。

調査対象

検体数は各検査所20頭（千葉県東総40頭）とし、合計180頭（ピッシング実施機関80頭、ピッ

シング非実施機関100頭。延360検体)について採取した食肉を用いて調査した。

実施方法

・食肉採取

食肉解体処理の際に脊椎外側部に付着している食肉を、胸部(頸膨大部:第5頸椎~第3胸椎)及び腰部(腰膨大部:第1腰椎~第2腰椎)各50gを買い取り等により入手した。

・材料調製

食肉をミンチ状に細切し、乾いた綿棒の綿球部を差し込み、綿球部を試料希釈バッファー1mlに懸濁したものを試料溶液とした。綿棒を差し込む際には、綿球部に肉片又は脂肪がなるべく付着しないように実施する。綿棒の差し込みは、場所を変えて5箇所で行い、綿球部に脂肪及び肉片が付着しないように実施した。

・ELISA

血液中の脳・脊髄組織調査と同様に実施した。

3. 血液への脊髄組織添加試験

200mg/mlの脊髄組織100 μ lを血液900 μ lに加え、これを血液で2倍階段希釈して、20、10、5、2.5、1.3、0.7、0.4、0.2mg/mlを調製した。

調整後の血液50 μ lをキット付属の試料希釈バッファー950 μ lに添加し、各濃度の吸光度を測定した。4回測定した数値の平均を算出した。

4. 食肉への脊髄組織添加試験

200mg/mlの脊髄組織をキット付属の希釈バッファーで2倍階段希釈して、200、100、50、25、12.5、6.3、3.2mg/mlを調製し、それぞれの100 μ lをミンチ状に細切した食肉5gに添加し、よく攪拌したのち、差し込んだ綿棒の綿球部を希釈バッファー1ml中に懸濁したものを試料材料とした。4回測定した数値の平均を算出した。

5. アンケート調査

本調査に協力した9機関にスタニングからシャックリングまでに要する時間及びスタニング孔からの脳組織の流出の有無についてアンケート調査した。

(研究倫理面への配慮)

本研究に関する採材は、通常の解体処理工程の過程で実施したものである。

生前血については、採材の際に局所的な出血を伴い商品価値が低下することがあることから、あらかじめ所有者の了解を得てから実施するとともに、牛に苦痛を与えることのないよう動物愛護の精神に基づき、採血を実施した。

神奈川県食肉衛生検査所では、通常ピッシングを実施している工程を20頭だけピッシング非実施で処理を依頼したので、シャックリングまでの従業員の労働安全に特に配慮した。

C. 研究結果

1. スタニング及びピッシングに起因する血液を介した脳・脊髄組織汚染調査結果

ピッシング実施機関及びピッシング非実施機関の生前血、放血及び心残血における各機関ごとの吸光度を表1に、胸部及び腰部の食肉における各機関ごとの吸光度を表2に示し、スタンダード1(std1):0.0%、スタンダード2(std2):0.1%、スタンダード3(std3):0.2%、スタンダード4(std4):0.4%)により描いた標準検量線から換算した数値(肉中換算濃度(%))を表3及び表4に示す。

また病畜と室で採取した85頭(ピッシング非実施)の生前血、放血、心残血の数値を表5に示す。

統計的処理は、統計ソフトSPSS(ver.11.0)を使用し、肉中換算濃度(%)について実施した。

各データをKolmogorov-Smirnov検定で正規性を検定したところ、ピッシング非実施の腰部のみ正規性が認められ、それ以外では正規性が認められなかったことから、各データの比較にはノンパラメトリック検定(Mann-Whitney検定及びWilcoxon検定)を実施した。

健康畜223頭については、生前血、放血及び心残血についてグループ間(ピッシング実施機関及びピッシング非実施機関)及びグループ内(生前血と放血、生前血と心残血)での検定の結果、グループ間及びグループ内での有意差は認められなかった。

ピッシングを実施した際の放血と心残血の間で有意差が認められ（有意水準0.05%）、心残血の方が高い値を示した。

病畜と室で処理された85頭については、生前血と放血、生前血と心残血の間に有意差が認められ（有意水準0.05%）放血及び心残血が生前血よりも高い値を示した。

青森県田舎館食肉衛生検査で実施した血液検査結果のうち、1頭の吸光度が生前血0.678、放血0.496、心残血0.515（std1 0.054、std2 0.285、std3 0.534、std4 1.014）であったが、20頭のなかで棄却検定を実施した結果、異常値ということで統計的処理には含めなかった。

2. 脊椎外側部に付着する食肉中の脳・脊髄組織汚染調査結果

脊椎外側部の食肉については、胸部及び腰部においてピッシング実施の80頭とピッシング非実施の100頭の間で有意差は認められなかった。

胸部と腰部の間にはピッシング実施の有無に係わらず有意差が認められ（有意水準0.05%）、腰部よりも胸部の方が高い値を示した。

3. 血液への脊髄組織添加試験

脊髄組織を添加した血液の吸光度と脊髄濃度の関係を表6及び図1に示した。血液中の脊髄濃度と吸光度はほぼ直線的な関係を示した。

血液中脊髄組織濃度0.2mg/ml（キット試料中濃度8 μ g/ml、ウェル中脊髄0.4 μ g）とブランク（血液中脊髄濃度0.0mg/ml）は目視では判別しにくいものの、吸光度は倍の値を示し、十分検出可能であった。

4. 食肉中への脊髄組織添加試験

ミンチ状に細切した食肉5gに希釈バッファーで濃度調製した脊髄組織液を100 μ lずつ添加し、0、0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.4%の脊髄組織含有食肉を作製した。食肉中の脊髄組織濃度と吸光度の関係を表7及び図2に示した。食肉中の脊髄組織濃度と吸光度はほぼ直線的な関係を示した。

0.1、0.2、0.4%の脊髄組織を含む食肉の吸光度はそれぞれstd2、std3及びstd4の吸光度とほぼ一致した。

5. アンケート調査

1) スタニングからシャックリングまでに要する時間

ピッシング実施機関では69.0 \pm 36.1（N=5）秒、ピッシング非実施機関では203.0 \pm 237.2（N=5）秒であった。

2) スタニング孔からの脳組織流出の有無

ピッシング実施機関（N=5）では、流出ありが2、ときどき流出ありが3であり、ピッシング非実施機関（N=5）では、流出なしが5であった。

D. 考察

BSEスクリーニング全頭数検査等の実施により、食肉の安全確保は図られているが、さらなる安全確保の観点から、国内におけるスタンニング及びピッシングと血液中の脳・脊髄組織汚染の関連について調査検証を行った。また、併せて、食肉の神経組織汚染のモニタリング方法の適否についても検証した。

脊髄組織の血液添加試験では、肉眼的には、2.5mg/ml（希釈バッファー中濃度125 μ g/ml、ウェル内脊髄6.25 μ g）まで判別可能であるが、それ以下の濃度（0.2mg/ml（希釈バッファー中濃度8 μ g/ml、ウェル内脊髄0.4 μ g））においても吸光度で比較することによりブランク（脊髄組織不含血液）と判別することが可能であり、キットが今回の調査に利用可能であることが判った。

また食肉中の脳脊髄組織の検出についても添加試験の結果十分利用可能であることが判った。

スタンニング方法によっては、血液中に中枢神経組織が含まれ、powered air injection stunning を実施した15頭の33%に中枢神経組織の塞栓が認められたとの報告もある

（Anil *et al*,1999）。

また、captive bolt stunning とピッシングを併用した場合6%（16頭中1頭）に中枢神経の塞栓が認められたが、頭蓋骨を貫通しないスタンニングを実施した場合（調査対象15頭）又は頭蓋骨を貫通するスタンニングを実施してもピッシングを実施しない場合（調査対象14頭）には中枢神経組織の塞栓が認められなかったとの報告がある（Anil *et al*, 1999）ことから、今回、ピッシン

グ実施機関及びピッシング非実施機関において血液中の脳・脊髄組織の有無をELISAで調査したが、生前血、放血、心残血の比較では、ピッシング実施機関とピッシング非実施機関の間に有意な差は認められなかった。

また、各グループ内での比較では、ピッシング実施機関における放血と心残血の間に有意な差が認められ、それ以外では有意な差は認められなかった。

放血と心残血の間で有意な差が認められてはいるが、生前血と放血、生前血と心残血の間では有意な差が認められなかったことから、スタニング又はピッシングの影響ではないと思われる。

ELISAは同一ロット、統一手順で実施したにも係わらず、検査機関ごとのデータに若干バラツキが認められるが、これは検査実施者が異なること、スタニング実施者が異なること及びピッシング時の挿入ワイヤーの長さの違い等があるためと考えられる。

各検査機関のデータにバラツキがあることから、吸光度での比較ではなく、各機関ごとに標準液により描いた標準検量線から肉中換算濃度(%)を求め、統計処理を行った。

病畜と室で処理された牛85頭を対象とした同様の調査では、ピッシング非実施であるにも係わらず、放血及び心残血が生前血よりも有意に高い値を示した。それぞれの値が検出下限値であるスタンダード2より小さい値での議論ではあるが、スタニングに用いられているボルトピストルが脳を損傷し、その結果血液中に脳組織が混入している可能性が示唆された。

このことから、頭蓋骨に孔を開け、脳を損傷する危険性が高いスタニングではなく、脳組織を損傷しないスタニング方法の開発が求められるところであるが、現実に頭蓋骨を貫通させず、牛を気絶させるスタニング方法を開発している国内の企業もあり、実用化が待たれる。

脊椎外側部の食肉において、ピッシング実施機関とピッシング非実施機関の間で有意な差は認められなかったが、一部の機関の調査では非常に高い値を示した(埼玉県中央食肉衛生検査センター、20頭中std3を超えたものが2頭、std4

を超えたものが1頭)。

血液中の脳・脊髄組織汚染調査の結果から考えると、これは血液を介してというよりも外的な要因による脳・脊髄組織の汚染の可能性が強いと考えられる。

また同一個体の胸部と腰部を比較した場合、腰部よりも胸部の方が有意に高い値を示した。これは、洗浄等により枝肉上部(後軀側)に付着していた脳・脊髄組織が枝肉下部(前軀側)へ流れ、脊椎孔を通して胸部食肉を汚染した可能性も考えられる。

アンケート調査の結果からは、スタニング後のピッシングによりスタニング孔から脳・脊髄組織が流出する可能性が示されており、食肉汚染の外的要因のひとつであると考えられる。

今回のキットを使用した血液調査の結果からは、ピッシングにより血液中に脳・脊髄組織が混入するという結論は得られなかったが、ピッシングの実施により食肉及びと畜場内の施設等が脳・脊髄組織に汚染される可能性があることから、ピッシングを実施する場合、スタニング孔からの脳・脊髄組織流出防止等の対策が必要となる。

一方、ピッシングを実施しない場合、シャックリングまでに時間がかかり、枝肉の品質に影響する(スポットの発生)ことから、ピッシングに代わると体の不動化方法を開発し、より迅速な放血及びシャックリングができるような対策を考える必要がある。

ピッシングを実施しなくても放血及びシャックリングまでが短時間に実施できる方法があれば、ピッシング実施による脳・脊髄組織汚染のリスクを低減でき、またBSE検査の検体である延髄の損傷もなくなる。

背割り前の脊髄除去が不十分な場合、背割りによって脊髄組織が枝肉等に付着するが、これは、枝肉等を十分洗浄することで除去できることは前回の調査で判っている。その場合、洗浄後の汚水に脳・脊髄組織が含まれているので、これについての処理対策が必要である。

スタニング及びピッシングの時点では、BSEの検査結果は判明していないので、洗浄後の汚水についてもBSE陽性を前提とした処置をとる

べきである。

生前血の吸光度はstd2（検出下限値）未満であるので、今後は生前血を採材しなくても放血及び心残血を材料とすることで血液中の脳・脊髄組織汚染をモニタリングできると思われるが、生前血がstd2以上の吸光度を示す場合がまれにあるので（今回は100頭中1頭）、大きな母数でモニタリングすることが必要である。

E. 結論

1. 今回のELISAキットを使用した調査では、欧州委員会科学運営委員会報告書で懸念されたようなピッシング実施の有無と血液中の脳・脊髄組織汚染の関連性は認められなかったが、ピッシングの実施により、スタンニング孔からの脳・脊髄組織流出の危険性が高いことから、ピッシングを実施しないことが望ましい。
2. やむを得ずピッシングを実施する場合は、スタンニング孔からの脳・脊髄組織流出防止の対策が必要である。
3. ピッシングを実施しない場合、シャックリング又はスティッキング（のど刺し）までに時間がかかり、スポット発生による商品価値の低下を招くおそれがあることから、ピッシングに代わると体の不動化方法を開発する必要がある。
4. 現行のボルトピストルを使用するスタンニングにおいても、ペネトレーター（打ち抜き用シャフト）の長さによっては、脳を損傷し、脳組織が血中に混入する可能性が示唆されたことから、ペネトレーターの長さを調製するとともに、頭蓋骨を貫通しないスタンニング方法の開発が必要である。
5. 背割り前の脊髄除去が不十分な場合、枝肉等に脊髄組織が付着する可能性が高い。これは枝肉等を十分洗浄することで除去できるが、洗浄後の汚水には脊髄組織が含まれている。枝肉等の洗浄はBSEの検査結果が判明する前に実施されるので、洗浄後の汚水についてもBSE陽性を前提として取り扱うべきであり、フィルター等でろ過した後に排水する等の対策が必要である。
6. 血液中に混入する脳・脊髄組織のモニタリン

グは放血及び心残血だけでも実施可能であるが、生前血で高い値を示す場合がまれにあるので、大きな母数でモニタリングをすることが必要である。

7. 食肉の神経組織汚染のモニタリング方法の適否の検証において、今回使用したキットの有用性が確認された。

F. 謝辞

本研究の統計学的処理に当たって、獣医学博士高橋正弘先生に多大なる助言をいただき感謝いたします。

G. 参考文献

- 1) Schmidt G.R.et al. J.Food Prot.62:390-393,1999
- 2) E.C.(EUROPEANCOMMISSION)2001, Preliminary Scientific Opinion and Report on Stunning Method and BSE Risks
- 3) 狂牛病 どう立ち向かうか. 矢吹寿秀 NHK「狂牛病」取材班. NHK出版 2001
- 4) 平成13年度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）
- 5) 平成14年度国産食肉高品質化推進指導事業食肉処理品質管理研修会・中央研修会テキスト（と畜処理工程におけるピッシング：社団法人 中央畜産会）

研究協力施設および研究協力者

青森県田舎館食肉衛生検査所
沼宮内春雄 藤本道志
群馬県中央食肉衛生検査所
奥野英俊 福田二三男 高田勇人
群馬県北部食肉衛生検査所
中林良雄 星野利得 塩野雅孝
埼玉県中央食肉衛生検査センター
名雪博二 平岡政治 高島將彦
千葉県東総食肉衛生検査所
鎌田知能 崎本 毅 木田浩司
長野県上田食肉衛生検査所
花里清人 木下充子 小野祥平
大阪府松原食肉衛生検査所
井ノ上壽壹 小川吉昭 松本治子
鹿児島県末吉食肉衛生検査所
中西 稔 今吉正人 小尾岳志

表1 各機関別血液中脳・脊髄組織調査結果

調査実施機関 (ピッシング実施) N=122		生前血	放血	心残血	スダグ-ト1	スダグ-ト2	スダグ-ト3	スダグ-ト4	備考
群馬県北部食肉衛生検査所	平均	0.052	0.049	0.052	0.050	0.235	0.417	0.712	尾静脈
	標準偏差	0.015	0.018	0.017	0.010	0.015	0.044	0.029	
埼玉県中央食肉衛生検査センター	平均	0.088	0.085	0.098	0.045	0.281	0.529	0.965	尾静脈
	標準偏差	0.026	0.028	0.034	0.025	0.015	0.018	0.039	
千葉県東総食肉衛生検査所	平均	0.050	0.051	0.053	0.032	0.360	0.670	1.311	尾静脈
	標準偏差	0.017	0.017	0.018	0.005	0.067	0.128	0.266	
大阪府松原食肉衛生検査所	平均	0.076	0.076	0.077	0.039	0.274	0.517	0.934	頸静脈
	標準偏差	0.035	0.039	0.045	0.002	0.032	0.062	0.115	
神奈川県食肉衛生検査所	平均	0.048	0.047	0.051	0.033	0.236	0.461	0.990	尾静脈
	標準偏差	0.026	0.024	0.029	0.004	0.014	0.029	0.098	
調査実施機関 (ピッシング未実施) N=101		生前血	放血	心残血	スダグ-ト1	スダグ-ト2	スダグ-ト3	スダグ-ト4	備考
青森県田舎館食肉衛生検査所	平均	0.059	0.060	0.061	0.042	0.331	0.620	1.175	尾静脈
	標準偏差	0.017	0.015	0.019	0.010	0.050	0.091	0.165	
長野県上田食肉衛生検査所	平均	0.050	0.048	0.049	0.038	0.454	0.837	1.620	尾静脈
	標準偏差	0.012	0.011	0.017	0.002	0.081	0.134	0.220	
群馬県中央食肉衛生検査所	平均	0.057	0.057	0.054	0.043	0.160	0.282	0.520	尾静脈
	標準偏差	0.018	0.018	0.016	0.005	0.010	0.012	0.032	
鹿児島県末吉食肉衛生検査所	平均	0.068	0.064	0.064	0.034	0.383	0.741	1.387	尾静脈
	標準偏差	0.029	0.028	0.029	0.005	0.017	0.036	0.091	
神奈川県食肉衛生検査所	平均	0.055	0.053	0.053	0.029	0.272	0.517	0.993	尾静脈
	標準偏差	0.021	0.017	0.020	0.003	0.039	0.068	0.141	

