

15. トランスジェニック培養細胞株を用いた感染実験解析

分担研究者 小野寺 節 東京大学大学院教授

研究要旨 様々な動物のプリオン遺伝子を分離した。また、1型プリオン遺伝性欠損マウスから神経細胞株を樹立した。これらの不死化神経細胞株に対し、マウス、ウシ、ハムスター由来のプリオン蛋白遺伝子を導入した。目下、これらの細胞株における病原体感受性について、研究プロトコルを作製中である。

A 研究目的

ウイルスを含め、病原体研究の歴史は動物を用いた研究から、*in vitro*の細胞株を用いた研究への発展が大きな流れである。従って、プリオン研究についても、動物を丸ごと用いた研究から *in vitro* への解析研究への流れが必然である。我々はこの様な観点から、プリオン感染実験において、*in vitro* へのモデル系の確立を目指す。同時に、プリオン持続感染細胞樹立系を目指し、病原体のより明確な解析を目指す。

B 研究方法

- 1 レトロウイルスヘクターを用いて、SV40 LargeT 抗原遺伝子を導入し、神経細胞の不死化操作を行う。
- 2 1型プリオン遺伝子欠損マウス (Doppel 蛋白非産生) の脳神経細胞に対して、不死化操作を行い、神経細胞株の樹立を行う。
- 3 ヒト、羊、ハムスター、牛からプリオン遺伝子をクローニングし、レトロウイルスヘクターを用いて、プリオン遺伝子欠損神経細胞株を導入する
- 4 これらの導入プリオン遺伝子が十分に発現している事を、ウエスタンブロット、FACS、蛍光抗体法を用いて確認する。
- 5 プリオン遺伝子再発現株を用いて、病原体の感染実験を行う。CJD 病原体については、米国カリフォルニア大学の Dr Prusiner と共同実験とする。BSE 病原体についても、一部は、Dr Prusiner と共同実験とする。

C 研究結果

- 1 レトロウイルスヘクターを用いた不死化操作により、プリオン遺伝子欠損細胞 1 型 (Npl1, Npl2, Gpl1) を樹立した。Gpl1 はクリア細胞由来である。
- 2 これらの細胞株に対し、レトロウイルスヘクター、pMSCV-EGFP-puro を用いて、マウス PrP 遺伝子を導入した。
- 3 PrP 遺伝子導入細胞株は、プリオン蛋白を産生した。しかしながら、プリオン蛋白過発現細胞株は、FCS10%培地においても低増殖性を示した。
- 4 プリオン蛋白遺伝子欠損細胞株は、無血清培地においてアポトーシスを示した。これらの細胞株はプリオン遺伝子導入により、アポトーシスが抑制された。
- 5 さらに、プリオン遺伝子欠損細胞株に対し、ハムスタープリオン遺伝子および牛プリオン遺伝子を導入した。
- 6 また、部分欠損プリオン遺伝子欠損細胞株を導入され、10%FCS 培地で、アポトーシスを出現した。これらの細胞はむしろ、無血清培地においてアポトーシスが抑制された。

D 考察

プリオン遺伝子過発現および PrP^{Sc} 発現により、神経細胞株はアポトーシスを出現した。これらの点はプリオン蛋白の配列の一部にアポトーシスを増強させる成分を含む事を示している。また、他種動物 PrP 遺伝子発現細胞株を樹立する事により 感染実験が可能となった。

E 結論

世界で最初に不死化プリオン遺伝子欠損神経細胞株を樹立する事により、新たな動物種 PrP 遺伝子を有する細胞株の樹立が可能となった。また細胞障害の *in vitro* モデルも樹立された。

F 健康危険情報

ウン型 PrP 発現細胞株の樹立により、BSE 病原体分離の基礎研究が準備された。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakudo, A , Lee, D C , Saeki, K , Nakamura, Y, Inoue, K , Matsumoto, Y, Itohara, S , and Onodera, T Impairment of superoxidase dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line *Biochem Biophys Res Commun* 308 660-667, 2003
- 2) Nakamura, Y, Sakudo, A , Saeki, K , Kaneko, T, Matsumoto, Y, Toniolo, A , Itohara, S , and Onodera, T Transfection of prion protein gene suppress coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells *J Gen Virol* 84 3495-3502, 2003
- 3) Sakudo, A , Hamaishi, M , Hosokawa-Kanai, T, Tsuchiya, K , Nishimura, T, Saeki, K , Matsumoto, Y, Ueda, S , and Onodera, T Absence of superoxide dismutase activity in a soluble cellular isoform of prion protein produced by baculovirus expression system *Biochem Biophys Res Commun* 307 678-683, 2003
- 4) Sakudo, A , Lee, D C , Saeki, K , Matsumoto, Y, Itohara, S , and Onodera, T Tumor necrosis factor attenuates prion protein-deficient neural cell death by an increase in Bcl-2 expression *Biochem Biophys Res Commun* 310 725-729 2003

16. 疑似患者畜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）疑似患者畜 15 頭を供試し、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、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す個体は認められていない。15 頭のうち 4 頭を鑑定殺したか、異常プリオン蛋白の ELISA 検査結果は全頭陰性であった。

脳内接種による BSE 感染牛作出のため、接種部位、角度、接種量および接種時における脳乳剤の漏出防止方法を検討後、8 頭の実験感染牛を作出し、継続観察中である。

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、わか国における 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、疑似患者畜およびプリオンの脳内接種による人工感染牛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

I 疑似患者畜を用いた生前診断法の検討

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、継続観察中の BSE 疑似患者畜 15 頭（当初導入した 18 頭のうち 3 頭が平成 14 年度中に死亡）を供試し、定期的な臨床症状の観察を行うとともに、血液、尿、脳脊髄液の採取を行い、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。なお、これらの牛は 75～8 歳を目途に鑑定殺処分する計画である。

(1) 臨床症状観察

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、歯きしり、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、飛節のナノクル
- 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、血液および脳脊髄液の諸検査
尿および血液は 2 か月毎、脳脊髄液は 4 か月毎に採取し、下記の項目を測定した。

① 尿

異常プリオン蛋白 ウェスタンブロッティング法
プロテアーゼ サイモグラフィ

② 血液

- ・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-chol、Alb、GOT、ALP、 γ GTP、CPK、NEFA、TG、 β -OH、CREA

③ 脳脊髄液

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

(3) 組織中のプリオン蛋白質検査

死亡あるいは鑑定殺処分した疑似患者については延髄門部をサンプルとしてELISA法により、異常プリオン蛋白質の検出を行った。また、脳、脊髄、回腸遠位部、五大臓器等を凍結およびホルマリンにより保存した。

解剖は場内焼却場併設の解剖室で行い、保存臓器以外のと体はすべて場内焼却場で焼却処分した。

II 実験感染牛を用いた生前診断法の検討

造影剤を注入した後のCTスキャンにより、接種部位および注入角度の検討を行った。

また、斃死子牛の頭部および子牛を用いて、色素剤注入により、接種量等を検討した。さらに、接種後における脳乳剤の漏出防止方法を検討した。

確立された接種法により人工感染牛を作出し、経過観察を行った。

(1) 脳内接種によるBSE実験感染牛作出法の検討

1) CTスキャンによる接種部位および角度の検討

トリルの穿孔部位およびカニューレ針の刺入角度を、CTスキャンを用いて検討した。

2) 色素剤注入による接種量の検討

斃死子牛の頭部(4頭)に手動トリルで開けた孔より、絵の具およびキムサ液を注入して、これらの色素剤の広がりから接種量および注入方法を検討し

た。また、子牛3頭を用いて、同様にキムサ液を注入して接種量等を検討した。

3) 脳乳剤の漏出防止方法の検討

歯科用レンン、強力接着剤およびステノレスネシを用いて、脳乳剤注入後の漏出防止方法を検討した。

(2) 脳内接種によるBSE感染牛の作出

1)、2)および3)の結果をもとに、BSE感染牛の脳乳剤を約2ヶ月齢の乳用種子牛9頭に接種した。接種後は、手術後の抗生物質投与、消毒等の処置を行った。

(3) BSE感染牛の臨床症状観察および諸検査

1) 臨床症状

作出したBSE感染牛の臨床症状は、試験Iと同様の項目について詳細な観察を1か月毎に実施する。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する。

2) 血液および尿の諸検査

BSE感染牛の血液および尿は、接種前、接種直後、1、2、3、4、5日後、1、2、3、4週後に採取し、その後1ヶ月毎に1回採取する。

測定項目は、試験Iと同様である。

3) 組織中のプリオン蛋白質検査

発症後、一定期間臨床観察を行った後に、解剖して、諸臓器における異常型プリオン蛋白質の検出と病理組織学的検査を実施する。

(倫理面への配慮)

疑似患者のサンプル採取および検査、死亡牛鑑定殺牛の剖検は、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、脳乳剤接種等の試験は、麻酔下で行い、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) 疑似患畜を用いた生前診断法の検討

- 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異常プリオン蛋白の検出は認められなかった。
- 3) 血漿蛋白質二次元電気泳動像における9カ所のスポットの推移を調べたところ、試験途中から出現するものか認められた。脳脊髄液中の蛋白、フトウ糖、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) 1頭から100kDaのプロテアーゼが検出されたか、この牛は鑑定殺時のELISA検査結果は陰性であった。
- 5) 血液一般生化学項目は、すべての牛が異常値を示すことなく推移した。
- 6) 鑑定殺牛4頭のELISA検査結果はすべて陰性であった。

(2) 実験感染牛を用いた生前診断法の検討

- 1) 接種部位は、角間隆起前縁より1cm鼻側、正中より2cm右側で、注入角度は、前後方向に垂直で、正中に向けて中脳に注入するのが適当であった。
- 2) 接種量は、0.5mlから1.0mlが適当であり、中脳から中脳水道に色素が多く分布した。また、注入は、半量を最深部で注入し、残った半量を、カニューレ針を抜きながら注入するのが適当であった。
- 3) 歯科用レンンおよび強力接着剤は、ともに穿孔部位を塞ぐのが困難であり、ノリノリで漏出液を吸引しながらステンレスネジを挿入することで漏出は無くなった。
- 4) BSE感染牛の10%脳乳剤を脳内接種した9頭のうち1頭は接種2日後に死亡したか、他の8頭については現在ま

て臨床的な異常は認められていない。

D 考察

1) 平成16年3月現在、鑑定殺牛も含めて、疑似患畜牛のなかでBSE感染か疑われる個体は認められておらず、今後も観察中の疑似患畜から感染牛が出現する確率は極めて低いことか予想される。

2) 接種部位は、既往の成果と同様であった。脳圧があることから、注入量を多くすることはできず、中脳全体に行き渡らせることか重要と考えられた。また、注入物は脊髄の方向に広がると考えられた。

脳乳剤の注入において、ステンレスネジを挿入することで漏出を完全に防止することか可能と考えられた。

現在、脳内接種した子牛9頭のうち8頭に異常が見られないことから、接種による事故は既往の成果(10%程度)と同様、少ないと考えられた。

E 結論

1) 現在まで、鑑定殺牛も含めて、疑似患畜牛のなかでBSE感染か疑われる個体は認められていない。今後も観察中の疑似患畜から感染牛が出現する確率は極めて低いことから、新たな基準で疑似患畜から除外される牛の鑑定殺処分を早めることで、頭数規模の縮小を図り、人工感染牛群の増頭をめさす必要がある。

2) 頭部角間隆起前縁より1cm鼻側、正中より2cm右側の部位で、カニューレ針を前後方向に垂直で、正中に向けて刺入することで脳内接種が可能であり、本法によりBSE実験感染牛8頭を作出した。

17. 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 国立感染症研究所筑波霊長類センター
研究協力者 小野 文子 社団法人予防衛生協会

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の確立を目的として、1 歳齢の育成雄カニクイサル 11 頭に異なる接種経路で BSE 発症ウシ 10%脳乳剤を投与した。経口および腹腔内投与したそれぞれ 1 頭を、3 ヶ月、6 ヶ月目に安楽殺し、主要組織を感染初期における BSE-P の体内動態解析実験に供試した。

経口投与群 3 頭、脳内接種群 3 頭、無処置対照 1 頭の計 7 頭について、BSE-P 投与後 1~3 ヶ月毎に行動解析、記憶能解析、脳波測定を実施し、カニクイサルの BSE-P 発症モデルにおける高次脳機能変化の評価とした。さらに、血球、血漿、髄液、尿を継時的に採取し、感染・発症に伴う BSE-P の体内動態解析用試料として保存した。

アノプテストによる両腕の運動機能と指迷路試験による記憶能には経口投与群、脳内接種群のいずれも BSE-P 接種後 3 ヶ月では顕著な変化は見られなかった。一方、経口投与した 1 頭において投与後 3 および 5 ヶ月目に突発性律動波 (PSD 様脳波) が観察されたか、BSE-P 感染との関係については不明である。

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。変異型 CJD 患者では行動異常、記憶力低下とともに孤発型 CJD 患者とは異なる脳波の変化が生じることが報告されている。今年度は、カニクイサルの BSE-P 感染モデルの有用性を評価する目的で、感染サルについて行動解析、記憶能解析および脳波測定を継時的に実施し、発症に伴う高次脳機能の変化を調査した。また、BSE-P 感染後 3 ヶ月および 6 ヶ月目の BSE-P の体内動態を解析する目的で、主要臓器を研究資源として提供した。

B 研究方法

1 実験群

1 歳齢の育成雄カニクイザル 11 頭を下記の 2

群に分け、BSE を発症したウシ (和歌山例) の 10%脳乳剤を、それぞれの経路で投与した。

1 感染初期の BSE-P 体内動態解析群

経口投与 (脳乳剤 20ml)	2 頭
腹腔内投与 (脳乳剤 20ml)	2 頭

2 中長期観察群

経口投与 (脳乳剤 20ml)	3 頭
脳内接種 (脳乳剤 0.2ml)	3 頭
無処置対照	1 頭

BSE-P 接種動物はすべて改良型の P3 アイソレータケーン内に収容した。本アイソレータはサル類か社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚、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よう改良した。

2 調査項目

第 1 群については、BSE-P を経口または腹腔内投与した後継時的に糞、尿を採取し、BSE-P

の排泄時期確定実験に供試した。また、経口、腹腔投与それぞれ各1頭ずつを投与後3および6ヶ月目に安楽殺し、主要臓器を感染初期のBSE-P体内動態解析に供試した。

第2群については、投与前後に以下の調査を1~3ヶ月毎に実施した。

- 1) 行動解析 (1ヶ月毎)
指定行動観察・ヒテオ撮影
アノプルテスト (行動評価)
- 2) 記憶能解析 (1ヶ月毎)
指迷路試験 ヒテオ撮影
- 3) 神経機能解析 (3ヶ月毎)
大脳皮質脳波
視覚、聴覚、体性感覚誘発電位
- 4) 定期的採材項目 (3ヶ月毎)
血液、尿、髄液

アノプルテストは両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、トレイ上に等間隔で置かれた4個の報酬をつかみ取る行動をヒテオ撮影し、報酬をつかみ取るまでの時間を計測した。

指迷路試験は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、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(24試行)を2日連続で実施し、成功率を長期記憶の評価とした。

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した。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を測定した。

第2群の個体はBSE-P接種後、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予定である。

C 研究結果および考察

図1にBSE-Pを経口投与した1頭の個体を測定した脳波を示す。この個体では投与後3

ヶ月目の測定で左右特に後頭部の測定でPSD様の単発性2~3相性の波形が認められた。(図中*)。同様の波形の出現は投与後5ヶ月目でも観察され、投与前に比べて明らかに出現頻度か異なっていた。孤発型CJD患者ではPSD様波形が観察されるか、変異型CJD患者では典型的なPDSは出現しないことか報告されている。今回観察された脳波は、周期性か比較的低いこと、類似の脳波パターンか頻度は低いか接種前の他個体にもみられることから、BSE-P感染と関連する可能性は低いと考えられるか、今後慎重に継続観察する必要かある。その他の経口投与した2頭および脳内接種した3頭のカニクイサルでは接種3ヶ月目では異常脳波は観察されていない。

図2-1および2-2に経口投与群および脳内接種群のアノプルテストによる行動観察の結果を示す。トレイの最遠部に置かれた第四報酬を獲得するまでの時間で行動異常の有無を評価した。図中右に示す行動異常を呈するパーキンソン病を発症したサルの例では、第四報酬獲得まで平均75秒必要としたか、BSE-P投与サルでは、経口投与群も脳内接種群も平均2秒以下で報酬を獲得しており、両腕の行動に異常は認められなかった。

図3-1および3-2に経口投与群および脳内接種群の指迷路試験を用いた記憶能評価の結果を示す。これらのサルはP3導入前に習得訓練を終了しており、本試験である2回のランダムテストでいずれも80%以上の正解率を示すことから、長期記憶が成立していることを確認した後にP3内アイノレータに収容した。図右に一過性に記憶力を低下させる作用のある薬剤(スポコラミン)を投与したサルの正解率を参考に示す。P3施設内への収容という飼育環境の変化は長期記憶には大きな影響を与えず、P3収容後もBSE-P接種後のいずれにおいてもすべての個体かランダムテストで80%以上の正解率を示した。現在5ヶ月目の試験を実施中であるか、指迷路の正解率に著しい変化は生していない。今後は他の指標と併せて観察を継続し、発症に仕う行動および記憶能の変化を明らかにしてゆく予定である。

D 結 論

若齢カニクイサルに BSE-P を経口および腹腔内に投与し、投与後 3 ヶ月及び 6 ヶ月目に各 1 頭を安楽殺し、BSE-P 初期感染での体内動態解析用実験試料として提供した。BSE-P を経口および脳内に投与したカニクイサルについて、継時的に脳波測定、行動解析、記憶能解析を行った結果、経口投与した 1 頭で、投与後 3 および 5 ヶ月目に単発性 2~3 相性の波形（PSD 様脳波）の出現が観察された。投与後の時期から見て、発症の兆候と考えるのは難しいことから、BSE-P 感染との関連については今後詳細に継続観察する必要がある。アノプルテストによる両腕の行動と指迷路試験による記憶能評価では、経口投与群 3 頭、脳内接種群 3 頭のいずれも投与後 3 ヶ月では変化が認められなかった。今後は、血液、髄液、尿などの材料を定期的に採取 保存するとともに、行動および記憶能評価と脳波の測定を継時的に実施し、発症に伴う脳機能の変化を調査する予定である。

E 研究発表

1 論文発表

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* Inter Primatol 2003, 24 261-270

18. BSE モデル動物を用いた病理学的解析

分担研究者 高橋 秀宗 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 ウンプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスを作成しハイオアノセイ、異常プリオンの大量発現による診断技術の高感度化、病態病理の解析を最終目的とした。BSE を含む複数サンプルの遺伝子シーケンスを行い、ホルスタイン cDNA を選出し、発現ヘクターによる培養細胞での発現を確認した。作成されたウンプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスのウンプリオン蛋白発現は免疫染色によって確認した。大脳および、脊髄、脾臓の 2 次濾胞中心部に特に強い発現を認めた。

A 研究目的

BSE における迅速、高感度なアノセイ系確立、病態病理解析のためにウンプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウス作成を当初の目標とした。

B 研究方法

- 1 正常牛(和牛、ホルスタイン)、BSE牛、ヒト、カニクイサルの保存臓器から DNA を抽出した。
- 2 PCRによりウシプリオン遺伝子を増幅し、クローニングヘクターへサブクローニングした。
- 3 それぞれシーケンスを決定した。
- 4 データベースのシーケンスと比較した
- 5 さらに哺乳類発現ヘクターへcDNAをサブクローニングした。
- 6 293T細胞へトランスフェクトし、ウエスタンブロットによって発現を調べた。
- 7 作成されたトランスジェニックマウス、ウンプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスのウンプリオン発現を免疫染色によって比較した。
- 8 キ酸および塩酸処理によって染色性が消滅するかどうかを調べた。

C 研究結果

- 1 ウンプリオン遺伝子の 4 つある疎水性領域のうち 4 番目の領域にある 218 及び 222

番目のアミノ酸について E, R(1995 年)または K, E (1992 年) のシーケンスが報告されているか、和牛、ホルスタイン、本邦の BSE 例 4 例については全て E, E を示した。

- 2 発現ヘクターによる 293T 細胞における発現はウエスタンブロットによって確認できた(図 1)。ヒトプリオン蛋白との比較においては予想とおり大きな分子量を示した。
- 3 マウスプリオンノックアウトマウス(KO)をかけ合せ免疫染色学的解析を行った。トランスジェニックマウス(TG), KO, KO かつ TG (-/+), KO かつ TG (+/+) を比べたところ KO 以外でウンプリオン発現はよく確認された。特に KO かつ TG (-/+), KO かつ TG (+/+) で脾臓の 2 次濾胞の胚中心と大脳神経細胞が良く染まっていた。脾臓の 2 次濾胞の tingible body macrophage 付近にある follicular dendritic cell (FDC) と思われる細胞にもウンプリオンの発現を確認できた(図 2)。
- 4 キ酸および塩酸処理によりウンプリオン蛋白の染色は消滅した。

D 考察

各種 BSE 病原性を調べ病態病理を解析するためにハイオアノセイは大変有用である。本邦の BSE 4 例、ホルスタイン、和牛のプリオン

遺伝子のシーケンスを調べたところアミノ酸 218, 222 は全て EE 型であることがわかったため EE 型のウソプリオン発現マウスの作成を行うこととした。脳と免疫系の両方に発現させるためにアクチンプロモータ下に発現ヘクターを構築し、TG を作成した。脾臓の 2 次濾胞の FDC と思われる細胞にもウソプリオンの発現を確認できたため、今後 BSE の増殖が脾臓、脳で認められることかできると予測する。またウソプリオンの抗体による染色性はキ酸および塩酸処理で消滅したため発現されたウソプリオン蛋白は正常性を保っていたと考える。

E 結論

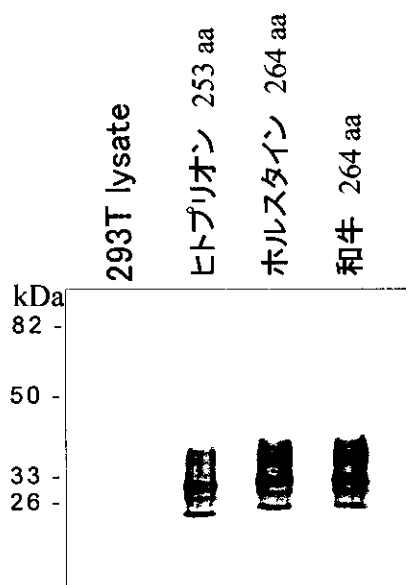
各種 BSE 病原性を調べ病態を解析するためのハイオアノセイとしてウソプリオン発現マウスプリオンノクアウトマウスの作成を行った。免疫染色学的解析により BSE の増殖が行われると考えられる部位（脳、脾臓）に多量の発現が認められ BSE 病原性、病態解析に有用であると推測された。

F 研究発表

- 1 論文発表
なし
- 2 学会発表
なし。

G 知的所有権の取得状況

なし



IB.6H4

図1 構築したプリオン発現ベクターによるヒト培養細胞（293T細胞）での正常プリオン蛋白の発現（イミュノブロット 抗体 6H4）



図2 ウンプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスの脾臓の抗プリオン抗体（44B1）による免疫染色図。

19. 脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するためのとさつ解体処理方法の開発

分担研究者 佐々木 裕之 埼玉県中央食肉衛生検査センター所長

研究要旨 国内で初めて牛海綿状脳症(BSE)の発生が確認されて以来、とちく場においては、BSEの全頭検査を初めとする、特定部位の除去・焼却、背割り前の脊髄吸引等の安全対策が講じられている。しかし、とさつ解体処理における脳・脊髄破壊行為（ピノンク）により、脳・脊髄組織が血液を介し、筋肉及び内臓等に移行する可能性が否定できないことから、ピノンクと肉中脳・脊髄組織濃度の関連性について調査したか、明らかにすることはできなかった。また、とさつ解体から市販までの処理流通段階における牛肉中の脳・脊髄組織残留状況を調査した結果、とちく場の枝肉及びカノト工場のフロック肉から、脳・脊髄組織を検出した。これらの結果と全国のとちく場の調査から、安全な食肉のとさつ解体処理方法について検討した。

研究協力機関及び研究協力者

長野県上田食肉衛生検査所 花里清人
群馬県中央食肉衛生検査所 鈴木宣夫
群馬県北部食肉衛生検査所 中林良雄
宮崎県小林食肉衛生検査所 廣瀬正夫
鹿児島県末吉食肉衛生検査所 中西 稔
千葉県東総食肉衛生検査所 鎌田知能
神奈川県食肉衛生検査所 沢谷弘志

A 研究目的

牛のとさつ解体時において、頭蓋骨に穴を開けて気絶させるスタンニング及び不動化のために脳・脊髄を破壊するピノンクを実施した場合、破壊された脳・脊髄組織が血流を介し、全身に移行する恐れがあることから、昨年度は牛のとさつ解体時におけるピノンクの影響を調査する目的で、とさつ前後の血液あるいはとさつ後の筋肉に存在する脳・脊髄組織を測定するとともに、ピノンク後のとたいの状況などについて調査した。その結果、スタンニング孔からの脳・脊髄組織の流出を認めたか、血液を介した全身への汚染は、確認できるまでに至らなかった。

そこで本年度は、検査対象数を増やして、筋肉中の脳・脊髄組織含有量を測定することにより、ピノンクの影響を調査する。さらに、とさつ解体直後の牛枝肉、カノト工場て加工され

たフロック肉及び小売店で販売されている各種牛肉の脳・脊髄組織残留状況を調査し、とさつ解体時の汚染原因を究明するとともに、その汚染が食肉の加工処理工程において、どのように影響しているかを調査する。また、全国の牛を取り扱うとちく場の解体処理方法を調査することにより、安全な食肉のとさつ解体処理方法を構築する。

併せて、RIDA スクリーン脳・脊髄組織含有テスト（生肉および拭き取り 定量用）（以下、「キント」という。）を用いて側定するにあたり、キントの性能及び試料の前処理方法について検討する。

B 研究方法

1 検査キントの性能及び試料の前処理方法の検討

牛脊髄乳剤を生理食塩水で2倍段階希釈した後、その0.1mlをキント希釈液1mlに添加し、脳・脊髄濃度を測定した。本キントは、肉中脳・脊髄組織含有濃度をグリア繊維細胞酸性タンパクを検出するELISAで、スタンダード（0.0、0.1、0.2、0.4%）のOD値から検量線を求め、検体の換算濃度を算出するもので、検出限界は0.1%である。使用した脊髄は、延髄に最も近い部分の片側を均等に採取し、細胞破碎装置を用い乳剤とした。

また、牛挽肉 10g に、脊髓を 0.1% 添加し、4°C と -20°C に 24 日間保存し、キントを用いて、経目的に含有濃度を測定した。脊髓を添加調整した挽肉は、4°C、-20°C それぞれ測定回数分作成し、測定時に室温に戻し、乾いた綿棒を 5 本差し込み、それぞれキント希釈液 1ml に振り出して ELISA 試料とした。

試料の前処理方法の検討では、脊髓を添加した挽肉 0.5±0.1g に 3 倍量のキント希釈液を加え直接振り出し、遠心上清を ELISA 試料とする方法（以下、「振り出し法」という。）とキント説明書に従い、乾いた綿棒を挽肉中に差し込み、その綿棒を 1ml の希釈液で振り出し ELISA 試料とする方法（以下、「綿棒法」という。）について、添加量を変え比較した。

2 ピンシクの有無による肉中脳 脊髓濃度の比較

とさつ解体時に、ピンシクを実施していないとちく場 4 施設と実施しているとちく場 4 施設で処理された牛枝肉の肉中脳 脊髓含有濃度を、各施設について 100 検体ずつ調査した。検査材料は、背割りによる汚染の影響が少ないと思われる枝肉中心部を用い、部位は頸部の筋肉とした。採取した筋肉は、細切後、乾いた綿棒を差し込み、1ml のキント希釈液で振り出し ELISA 試料とした。ピンシク未実施施設については、長野県上田食肉衛生検査所、群馬県中央食肉衛生検査所、宮崎県小林食肉衛生検査所、鹿児島県末吉食肉衛生検査所、ピンシク実施施設については、群馬県北部食肉衛生検査所、千葉県東総食肉衛生検査所、埼玉県中央食肉衛生検査センター、神奈川県食肉衛生検査所が検査を実施した。

3 牛肉の各処理段階における脳 脊髓組織含有濃度の測定

とちく場でとさつ解体された牛枝肉について、脳 脊髓組織含有濃度を拭き取り検査により測定した。拭き取り部位は、枝肉内側か第三頸椎周囲と最後胸椎周囲、外側か頸部、胸部及び腰部、そして脊髓と直接接していた胸椎椎孔の内壁で、1 カ所につき 100 平方センチメー

トルとした。採材は、枝肉の最終洗浄が終了し、冷蔵庫に保管される直前に乾いた綿棒で実施し、4 日間、計 28 頭の枝肉について検査した。

カント工場で加工された、ネック部分のフロック肉について、脳 脊髓組織含有濃度を拭き取り検査により測定した。検査したフロック肉は 11 個で、その表面を 18 から 20 カ所に分け、肉の表面すべてをキント希釈液で湿らせた綿棒により拭き取った。

市販食肉の脳 脊髓組織含有濃度を牛挽肉については、50g をストマノカー袋に採取均一化したのち、振り出し法により検体を処理し測定した。その他の牛肉については、表面をキント希釈液で湿らせた綿棒により、100 平方センチメートル拭き取り測定した。

なお、表面の拭き取り検査においても、キントで測定し得られた換算濃度を、便宜上、肉中 含有濃度とした。

4 牛を取り扱うとちく場の解体処理方法についての調査

全国食肉衛生検査所協議会加入機関に対し、アンケートによる調査を依頼した。回答のあった 146 施設のうち、1 日の平均処理頭数が 1 頭以上の 137 施設について集計した。

C 研究結果

1 検査キントの性能及び試料の前処理方法の検討

牛脊髓乳剤を生理食塩水で希釈し、キントで含有濃度を測定すると、牛により検出限界以上示した最終希釈倍数が、800 倍から 3200 倍と異なり、個体差が認められた（表 1）。

牛挽肉に脊髓を添加し、その含有濃度を測定すると（5 回の平均）、添加翌日 4°C と -20°C とともに減少したか、その後、ほぼ一定に推移した。また、4°C で 24 日目に増加の傾向を示した（図 1）。

牛挽肉 X、Y 及び数種の挽肉を混合した Z に、6 頭の牛から採取した脊髓を 0.05 から 0.2% の濃度で添加し試料とした。その試料を振り出し法と綿棒法により処理した後、キントで測定し、換算濃度を比較した。結果、振り出し法で

処理した試料は、綿棒法より2.6倍から最高で8.6倍高い換算濃度を示し、添加量より高値を示すものもあった。なお、無添加のものは、反応を示さなかった(表2)。

2 ピンシクの有無による肉中脳 脊髄濃度の比較

ピンシクを実施していないとちく場4施設と実施しているとちく場4施設で処理された牛枝肉の肉中脳 脊髄含有濃度を、各施設について100検体ずつ測定したところ、すべての値が、検出限界以下であるか、あえて比較すると、測定した各検査所間で差が認められた(表3)。検査所間に差が認められたか、ピンシク未実施群と実施群について比較したところ、ピンシクの有無による肉中脳 脊髄組織濃度の差は、認められなかった(表4)。そこで、枝肉の背割りを正中線からすらしめている宮崎県小林食肉衛生検査所と検体採取を背割り前に実施した群馬県北部食肉衛生検査所のデータを除いて比較すると、未実施群と実施群の平均値に差が認められた(表5)。

3 牛肉の各処理段階における脳 脊髄組織残留状況

とちく場における牛枝肉の脳 脊髄組織残留状況を表6に示す。換算濃度0.1%以上示したものを陽性とした。外側胸部以外は、脳 脊髄組織の残留が認められ、枝肉外側より内側すなわち背割り面の方が陽性率が高かった。また、胸椎の椎孔内壁からは100%検出し、特に、最大値が0.815%と高い値を示した。

カノト工場て加工された牛フロノク肉の脳 脊髄残留状況を表7に示す。11個のプロノク肉中、3個のプロノク肉の1検体ずつが陽性となった。特に、No9のプロノク肉が換算濃度0.338%と高い値を示した。

市販牛肉の脳 脊髄組織残留状況を表8に示す。国産牛挽肉114検体、挽肉以外の国産牛肉66検体、米国産牛肉7検体すべて陰性だった。しかし、挽肉で1検体、検出限界付近のものがあった。

4 牛を取り扱うとちく場の解体処理方法についての調査結果

アンケート調査の結果を図2に示す。スタンシクを頭蓋に穴を開けない方法で行っている施設はなかった。頭蓋に開いたスタンシク孔からの脳 脊髄流出に対し、防止対策を実施している施設が51%、ピンシクを実施していない施設が27.0%であった。

ピンシク器具の材質で、表面が平滑な合成樹脂製のものを使用している施設がピンシク実施施設のうち52.0%、枝肉背割り前の脊髄吸引量80%以上の施設が全体の33.6%、脊髄による汚染を防止するため、背割りを正中線からすらしめている施設が2.9%(ただし、このうち2施設は、平均処理頭数2頭以下)であった。また、背割り後に、枝肉に残った脊髄を削り、吸引除去する装置を使用している施設が51%、枝肉の自動高圧洗浄装置を使用している施設が38.0%であった。

一方、背割り前の脊髄吸引除去量か、不明あるいは無回答が32.8%であった。

D 考察

今回、脊髄乳剤を段階希釈し測定したことにより、脊髄に存在するクリア繊維細胞酸性タンパクの量に個体差があることが判明した。また、挽肉を用いた添加実験の結果から、キント説明書に従って測定した場合、得られた濃度は、添加量と同等かそれ以下であり、実際の検査では、脳 脊髄含有濃度を低く測定する傾向にあると思われた。

牛肉中の脳 脊髄組織検出濃度の推移を見ると、脳 脊髄組織による汚染後、日数が経過したものについても検出可能なことが判明し、残留状況調査に、十分利用可能であることが判明した。また、4°Cで24日後に検出濃度が上昇したのは、長期間の保存により水分が浸出したため、採材用綿棒に効率良く吸収したことによるものと考えられる。

挽肉中の脳 脊髄組織含有検査における検体処理方法の検討では、振り出し法で処理した検体は、添加量より高い値となることもあるが、綿棒法に比べ感度が高く、定性試験あるいは含

有量の比較には、活用できると考えられた。

ピノンクの有無による肉中脳 脊髄組織含有濃度の比較において、背割りの影響を考慮した場合、未実施群と実施群に差が認められたか、すべての値が検出限界以下のため、明確な結論が得られなかった。しかし、ピノンクにより破壊された脳 脊髄組織が血管内に侵入する可能性は、理論上ありえるので、処理工程中に脳 脊髄を破壊しない処理方法を行うべきと思われる。ピノンクを実施しないと、とさつ放血から解体処理に移るまでに時間がかかり、とたいを留めて置くためのスペース、作業時間の延長等問題も生じてくるので施設側の努力が必要である。また、今後は、肉中脳 脊髄組織含有検査における検出感度を上げるため、試料の前処理方法の検討が必要であると思われる。

牛枝肉の脳 脊髄組織残留状況では、枝肉外側より内側（背割面）、上部より下部（頸椎周囲）の残留率が高かったか、これは背割り時のノコギリ屑や潤滑水による汚染か、枝肉洗浄後も残留している結果と思われる。平成13年度厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）において、枝肉の洗浄効果は証明されているか、今回、汚染が完全には除去されないことが判明した。

枝肉表面の脳 脊髄組織汚染は、100%背割りによるものと言えるであろう。現状は、背割り前に脊髄吸引をしているとはいえ、吸引量には限界があり、背割りにより破壊された脊髄で、直接あるいは間接的に枝肉が汚染される。その後、枝肉を洗浄することにより、汚染の除去を行ってはいるか、背割り時における汚染を排除しない限り、枝肉の脳 脊髄組織残留をなくすることはできない。枝肉の汚染を最小限にするために、脊髄を破壊する正中線での背割りに代わり、左右とちらかにずらした背割りを行うべきと思われる。アンケート調査の結果、背割りをすらしている施設は、小規模のものを除くと現在2施設であり一般的でないことが判明した。背割りをすらすと、左右で枝肉の大きさや異なり、枝肉の売買において、問題が生じてくると考えられ、この背割り方法を普及させるには、

関係者の十分な理解が必要と思われる。なお、この方法で処理した場合も、脊椎の椎孔部分は、一部開放しており、背割り後に残った脊髄を除去することか可能である。また、背割りをすらすことにより、排水に脊髄組織が混入するのを防ぐことかでき、さらに BSE が発生した場合、とちく場施設及び環境の汚染を最小限に留めることかできる。

牛ブロック肉11検体中3検体から、脳 脊髄組織が検出された。Schmidtらは、末梢神経（坐骨神経）では、脊髄に比へグリア繊維細胞酸性タンパクの量が、4000分の1と報告していることから、今回、ブロック肉に脳 脊髄組織が残留していたと判定した。枝肉からブロック肉に加工する場合、表面の脂肪や冷蔵保管中に生じた変色部位等を削り除去しているか、とさつ解体時の汚染が除去されず残留していたと考えられる。

また、脊椎の椎孔内壁（脊髄と接していた部位）は、検査したすべての脊髄組織が残留しており、食肉カノト施設において、脊柱からの二次汚染の可能性もあり、細心の注意が必要と思われる。これについては、現在7施設で使用しているミーリンクカノター（枝肉に残った脊髄を削り、吸引除去する装置）を導入することにより改善できる可能性があると思われる。

市販牛肉の脳 脊髄組織残留状況では、検出限界に近い値もあったか、すべて陰性であった。しかし、ブロック肉では脳 脊髄組織の残留が確認されているので、検体数を増やす等の再検討が必要であろう。

E 結 論

1 挽肉中の脳 脊髄含有濃度測定に、検体を直接キント希釈液で振り出して、遠心上清を用いた場合、綿棒で検体を採取するより、検出感度が高くなった。

2 牛のとさつ解体時にピノンクを実施することにより、脳 脊髄組織が血流を介し、筋肉中に移行するか証明することはできなかった。

3 とちく場から小売り施設の各段階において、牛肉中の脳 脊髄組織残留状況を調査したところ、とちく場における枝肉、カノト工場におけ

るブロック肉から脳 脊髄組織を検出した。特に、脊椎の椎孔内壁からは、100%検出した。市販牛肉は、検出限界以下であった。

4 枝肉は、脳 脊髄組織に汚染されると洗浄では完全に除去することはできない。従って、血流を介して枝肉全体を汚染する可能性があるピニング、あるいは、背割り面を大量に汚染する正中線での背割りは、避けるべきである。

また、背割りを正中線からずらすことにより、BSE が発生した場合、施設及び環境の汚染を最小限に止めることかてきる。

F 参考文献

- 1) Schmidt G R et al 1999 The Department of Animal Sciences Colorado University
- 2) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金分担報告書「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
- 3) 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書「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

表 1 脳 脊髄組織含有テストの牛脊髄に対する反応

脊髄No	換算濃度(%) ^{a)}					
	× 200	× 400	× 800	× 1600	× 3200	× 6400 ^{b)}
1	0.656	0.403	0.183	0.088	0.045	ND
2	0.739	0.436	0.204	0.095	0.045	ND
3	0.443	0.236	0.105	0.050	0.025	ND
4	1.473	0.924	0.458	0.234	0.107	ND
5	1.653	1.043	0.509	0.274	0.131	ND
6	1.322	0.764	0.399	0.211	0.089	ND
7	1.431	0.971	0.469	0.239	0.114	ND
8	1.785	1.255	0.640	0.343	0.177	ND
9	1.468	0.967	0.586	0.243	0.112	0.035
10	1.331	0.893	0.384	0.221	0.109	0.045
11	1.159	0.658	0.258	0.156	0.074	0.035
12	1.616	1.156	0.639	0.304	0.153	0.068
13	0.703	0.386	0.173	0.081	0.040	0.019
14	0.845	0.434	0.216	0.109	0.052	0.028
15	0.977	0.517	0.247	0.122	0.057	0.031
16	1.155	0.700	0.312	0.167	0.075	0.047

a) 脊髄乳剤を生理食塩水で段階希釈後、RIDAスクリーン脳 脊髄組織含有テスト(生肉および拭取り・定量用)で測定し、換算濃度を算出。点線下線部は、換算濃度0.1%(検出限界)以上。

b) 脊髄の希釈倍数

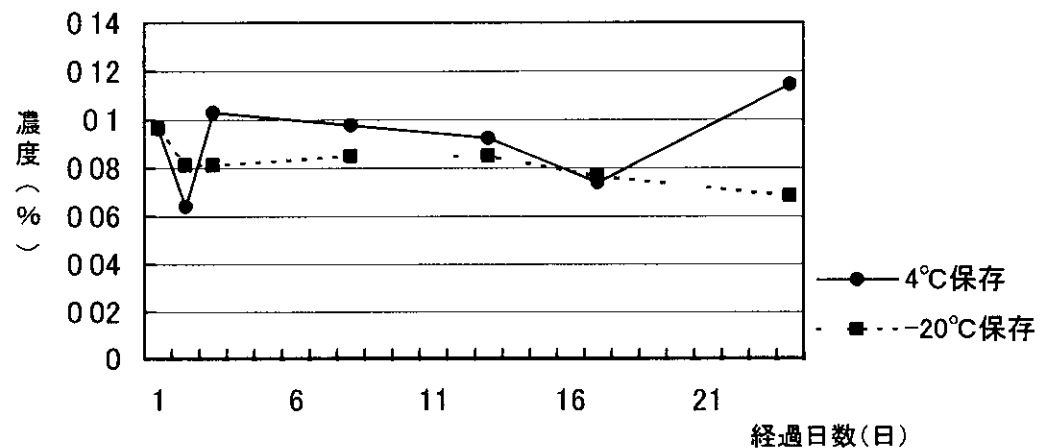


図 1 食肉中における脳・脊髄組織検出濃度の推移

表 2 挽肉中の脳 脊髄組織含有検査における検体処理方法の比較

No	試料 ^{a)}			換算濃度(%)		比 ^{d)}	備考
	牛挽肉	脊髄	添加量(%)	振り出し法 ^{b)}	綿棒法 ^{c)}		
1	X	—	—	0.000	0.004		挽肉コントロール
2	X	f	0.05	0.116	0.032	3.6	
3	X	f	0.1	0.263	0.080	3.3	
4	X	g	0.05	0.081	0.015	5.5	
5	X	g	0.1	0.330	0.062	5.3	
6	Y	—	—	0.008	0.001		挽肉コントロール
7	Y	h	0.05	0.086	0.010	8.6	
8	Y	h	0.1	0.218	0.049	4.5	
9	Y	i	0.05	0.026	0.010	2.6	
10	Y	i	0.1	0.050	0.012	4.0	
11	混合Z	J	0.1	0.288	0.065	4.5	添加後77日間凍結
12	混合Z	J	0.2	0.635	0.167	3.8	添加後77日間凍結
13	混合Z	k	0.1	0.107	0.018	6.1	添加後77日間凍結
14	混合Z	k	0.2	0.299	0.096	3.1	添加後77日間凍結

a) 挽肉に脊髄を一定量添加したもの

b) 挽肉を直接、RIDAスクリーン脳 脊髄組織含有テストの希釈液で振り出し、遠心上清を用い測定した場合

c) 挽肉に綿棒を差し込み その綿棒を希釈液で振り出し測定した場合(キット説明書)

d) 振り出し法により測定した換算濃度 — 綿棒法により測定した換算濃度

表 3 各調査機関における肉中脳・脊髄組織含有濃度の比較

調査機関	平均±標準偏差 (%)	他 機 関 と の 差								ピン グの 有 無
		長野 上田	群馬 中央	宮崎 小林	鹿児島 末吉	群馬 北部	千葉 東総	埼玉 中央	神奈川	
長野県上田	0.004 ± 0.011	—	○	×	○	○	×	○	○	無
群馬県中央	0.000 ± 0.005	○	—	○	○	○	○	○	○	無
宮崎県小林	0.003 ± 0.010	×	○	—	○	○	○	○	○	無
鹿児島県末吉	0.008 ± 0.006	○	○	○	—	○	×	○	×	無
群馬県北部	-0.008 ± 0.009	○	○	○	○	—	○	○	○	有
千葉県東総	0.007 ± 0.009	×	○	○	×	○	—	○	×	有
埼玉県中央	0.012 ± 0.008	○	○	○	○	○	○	—	○	有
神奈川県	0.008 ± 0.006	○	○	○	×	○	×	○	—	有

(各調査機関 100検体)

○ 含有濃度の平均に差がある(p<0.05)

× 差がない(p<0.05)

表 4 ピッシングの有無による肉中脳 脊髄含有濃度の比較

施 設	検体数	平均±標準偏差(%)
ピッシング未実施施設		
長野県上田 群馬県中央 宮崎県小林 鹿児島県末吉	400	0.004 ± 0.009
ピッシング実施施設		
群馬県北部 千葉県東総 埼玉県中央 神奈川県	400	0.005 ± 0.011
両者の間に差がない(p<0.05)		

表 5 ピッシングの有無による肉中脳 脊髄含有濃度の比較
(背割りを正中線で行い、検査材料をカット工場で採取した場合)

施 設	検体数	平均±標準偏差(%)
ピッシング未実施施設		
長野県上田 群馬県中央 鹿児島県末吉	300	0.004 ± 0.009
ピッシング実施施設		
千葉県東総 埼玉県中央 神奈川県	300	0.009 ± 0.008
両者の間に差がある(p<0.05)		