

2) Bリンパ球のハイブリドーマ法による株化: 異常プリオンの蓄積が確認された脾臓細胞由来のB細胞を、細胞融合パートナーとしてSP2/O ミエローマ株を用い、ポリエチレングリコール法により定法に従いB細胞ハイブリドーマを作製した。限界希釈法にてクローニングし、各クローンに関してPK 耐性プリオンを異常型プリオンとして検出した。

3) 脾臓ストロマ細胞、マクロファージ細胞の株化: C57BL/6 マウス脾臓より、各種培養条件を変えることにより、細胞株の樹立を試みる。検討する培養条件として、i) 基本培地 (RPMI1640、DMEM、aMEM 他)、ii) ステロイド系化合物 (プレドニゾロン等、リンパ球の増殖を抑制するため)、iii) 細胞外基質タンパク質 (コラーゲンゲル、フィブロネクチン等)、iv) 各種サイトカイン (M-CSF、GM-CSF、等)、v) フィーダー細胞 (3T3、L cell 等)。

4) BILL カドヘリン遺伝子欠損マウス: BILL カドヘリンはB細胞とマクロファージの一部に発現する細胞接着分子で、プロB細胞表面で代替軽鎖と結合する分子として我々がクローニングした。リンパ球に発現するカドヘリンとしては唯一のもので、Ca²⁺依存性にホモテピックな細胞接着を引き起こし、B細胞の分化段階に従ってその発現が制御されている。BILL カドヘリンは、Bリンパ球の他に小腸、胎児肝、マクロファージの一部に発現されている。BILL カドヘリン遺伝子の機能を解析するためにこの遺伝子の膜貫通部位の両側をコードするエクソン 16-18 を欠損させ、この分子を発現しないノックアウトマウスを作製している。このマウスに、TSE 脳乳剤 (Obihiro 株) を脳内接種および経口投与し、プリオン病発症過程を野生型マウスと比較観察した。

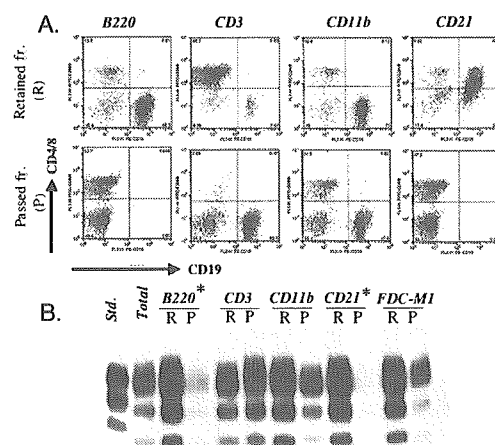
(倫理面への配慮)

本研究はヒト由来材料を用いず、研究用に確立された細胞株、プリオン株、マウス系統を用い、倫理上問題になる実験を含まない。

C. 研究結果

1) 免疫担当細胞の分画と異常プリオンの検出: 免疫系のどの細胞分画に異常プリオンが付随するかについて、感染研で作製されたウシ・

プリオン遺伝子トランスジェニックマウスにBSE 脳乳剤を接種して 256 日目の脾臓由来細胞を MACS カラムで分画する実験を行った (図 1)。



(図1)

図 1 A は、細胞表面マーカーに対する抗体 B220, CD3, CD11b, CD21, FDC-M1 により、MACS カラムに保持された (R) 分画とパスした (P) 分画の純度をフローサイトメトリーで検討したもの、B は各画分の単位細胞数あたりの PK 耐性プリオン (PrP^{Res}) のウエスタン・ブロットによる検出を示す。B220 抗体および、CD21 抗体でもっとも顕著に異常プリオンの存在をカラムで分離することができた。すなわち、異常プリオンが付随している細胞群は B220⁺/CD21⁺であることがわかる。

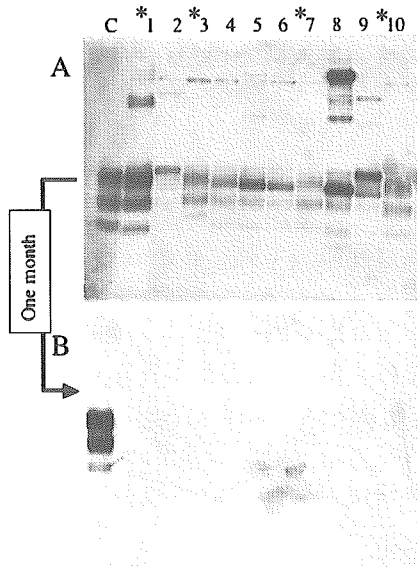
この B220⁺/CD21⁺の細胞群は主にB細胞亜群からなり、マクロファージの一部と FDC を含むと考えられる。このうち、B細胞に異常プリオンが付随している可能性をB細胞ハイブリドーマ法を用いて株化することにより検討した。

2) Bリンパ球のハイブリドーマ法による株化: 上記実験と同様のマウス由来脾臓を SP2/O ミエローマと細胞融合し、HAT 選択によりハイブリドーマを作製した後、クローニング後3週間目の各クローンについて、異常プリオンの存否を検討した (図 2)。

確立したハイブリドーマ・クローンのうち約半数に PK 耐性異常型プリオンが検出された。

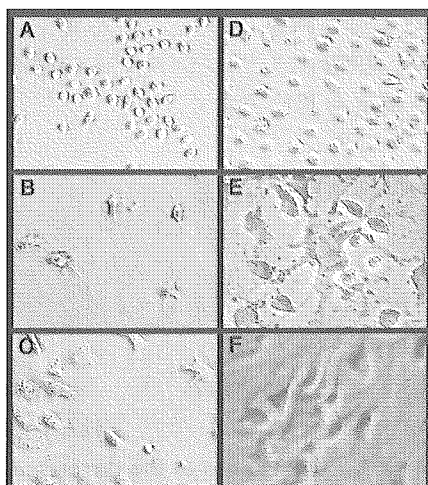
このことから、ハイブリドーマの確立初期にはB細胞由来の異常プリオンがハイブリドーマに保持されていたと考えられる。しかし同じ

クローンを1ヶ月後に調べてみると、異常型プリオンは全く検出できなかった。いろいろな可能性を検討する必要があるが、少なくともB細胞ハイブリドーマは異常プリオンを短期間保持するが、長期的に維持(増殖)する機構を持っていないと考えられる。この、異常プリオンを長期的に維持する機構(因子)について今後検討を要する。



(図2)

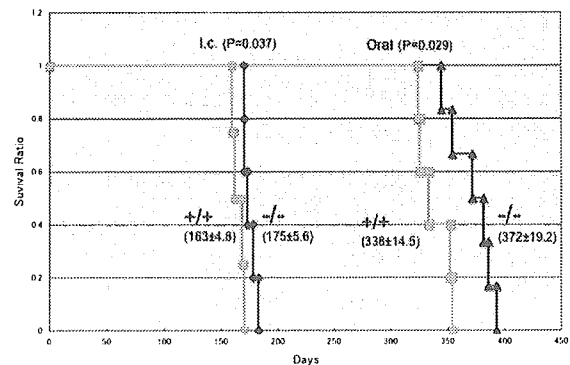
3) 脾臓ストロマ細胞、マクロファージ細胞の株化: ハイブリドーマ法で株化したB細胞では異常プリオンの長期維持が困難であったことから、脾臓の非リンパ球細胞すなわち、ストロマ細胞やマクロファージ細胞を株化する試みを行っている。正常マウスの脾臓から、培養条件を様々に変えることにより、これまでに複数の細胞株を得ている(図3)。現時点



(図3)

で、維持期間が4ヶ月ほどなので株の安定性が不明であるが、長期的に培養を続けることによって安定した株を確立させたい。これらの細胞株について、FDCへの分化能すなわちLT(リンホトキシン)/TNF(腫瘍壊死因子)存在下でFDCマーカーであるCD21/FDC-M1を発現できるか否か、また、試験管内で異常プリオンを保持する能力があるか否か等を検討して行く予定である。

4) BILLカドヘリン遺伝子欠損マウスの異常プリオン感受性: BILLカドヘリン分子はプロB細胞表面で代替軽鎖と呼ばれる分子と結合している。この代替軽鎖分子の性質がプリオン分子とよく似ていると考えており、BILLカドヘリン分子がプリオン分子とも相互作用する可能性が高いと考えている。この分子の遺伝子欠損マウスをすでに作成しているのでBILLカドヘリン・ノックアウトマウスのプリオン感受性を検討した。TSE脳ホモジェネートを脳内接種および経口投与し経過を観察した(図4)。

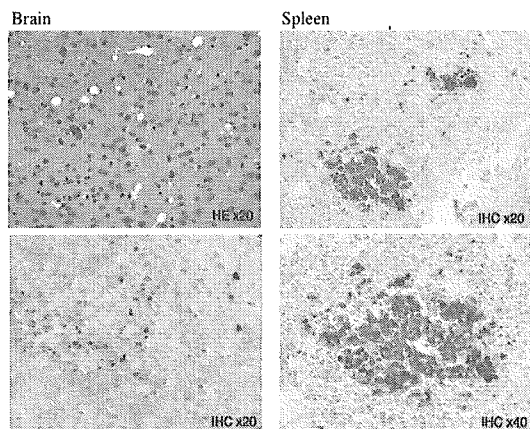


(図4)

野生型マウスとノックアウトマウスで平均生存日数が異なり、異常型プリオンを脳内接種した時は野生型とホモ個体でそれぞれ163±4.8、175±5.6日(p=0.037)、上部消化管投与した時はそれぞれ338±14.5、372±19.2日(p=0.022)と有意な延命が観察された。この差は、それほど大きいものではないが、最近報告された異常プリオン結合分子plasminogenの遺伝子ノックアウトマウスにおける差異よりも顕著である。

このBILLカドヘリン・ノックアウトマウスのTSE病変は、野生型と変わらず、脳において同様のTSE病理所見が観察される(図5)。また、脾臓においてもFDC様の細胞に異常型プリオンの蓄積が観察される。このことは、ノッ

クアウトマウスにおいても、末梢に投与された異常型プリオンが FDC への蓄積を経由して中枢神経系へ伝播し、TSE を発症する過程が進行していることを示唆する。



(図5)

D. 考察

脾臓において異常プリオンを保持している B220⁺/CD21⁺ の細胞群は主に B 細胞亜群からなり、マクロファージの一部と FDC を含む。ハイブリドーマ法を用いて株化した B 細胞では、ハイブリドーマの確立初期には異常プリオンが保持されていたにもかかわらず 1 ヶ月後には異常型プリオン量は検出限界以下に低下していた。このことから B 細胞ハイブリドーマは異常プリオンを短期間保持するが、長期的に維持 (増殖) する因子を欠損していると考えられる。その修飾分子候補として、補体成分、プラスミノゲン等の血清由来因子や、シャペロン等の細胞由来分子が考えられるが、これらの点を今後検討してゆきたい。

これまでに脾臓ストロマ細胞、マクロファージ亜群由来と考えられる細胞株の樹立を試み、幾つかの候補細胞を得ている。これらの細胞株について、FDC への分化能や試験管内で異常プリオンを保持する能力があるか否か等を検討することにより、異常プリオン伝播の *in vitro* モデルシステムの構築が可能であると考えられる。

ノックアウトマウスの解析によって発症に関与することが示唆された BILL カドヘリン分子について、BILL カドヘリンの臓器別の発現をみてみると、脾臓、骨髄などのリンパ組織に加えて小腸、肺などの粘膜組織に発現が認められる。すなわち、これらの組織での BILL カド

ヘリンの発現の欠如が TSE の発症遅延を引き起こしている可能性が高い。脾臓においては、BILL カドヘリンは、辺縁帯と B 細胞領域の一部の細胞に発現がみられる。FACS 解析により、これらの細胞は B 細胞およびマクロファージの一部であることが明らかになっている。これらの細胞上の BILL カドヘリン分子がプリオン病の発症に関与している可能性が考えられる。また、小腸においては、BILL カドヘリンは、小腸上皮細胞全体に発現が見られ、パイエル板ドーム上の短い微絨毛によって特徴づけられる M 細胞にも発現している。小腸上皮細胞に高発現する BILL カドヘリン分子の機能についてはまだ不明であるが、異常プリオンの取り込みが M 細胞を経由して起こるという報告があり、ノックアウトマウスではこの部位のカドヘリンがないために延命している可能性もある。その関与機序が B 細胞やマクロファージに発現する BILL カドヘリンによるものなのか、小腸上皮に発現する分子によるものなのか、また、両分子の間に相互作用があるか否かなどを検討する必要がある。

E. 結論

B リンパ球・マクロファージ亜群および、粘膜上皮に発現する BILL カドヘリン分子を欠損したマウスではプリオン病の発症遅延がおこる。発症遅延の原因は、(1) 小腸上皮に発現する BILL カドヘリンの欠損による異常プリオン侵襲率の低下、または (2) BILL カドヘリン欠損による B 細胞・マクロファージ細胞の機能変化に起因する異常プリオンの中枢神経系への伝播率の低下が考えられる。並行して進めている免疫担当細胞の株化による異常プリオン増殖の試験管内モデルシステムの確立と併せて今後解析を進めてゆく。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi K, Melchers F, Shimizu T: Lymphocyte-expressed BILL-cadherin/cadherin-17 contributes to the development of

B cells at two stages. Eur J Immunol
35:957-963, 2005.

2. 学会発表

- 1) 大西和夫、山口沙由里、樋口好美、佐多徹太郎、山河芳夫: BILLカドヘリン(cadherin-17)遺伝子欠損マウスにおけるプリオン病発症遅延. 第28回日本分子生物学会年会(福岡)2005.12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

15. BSE リスク解明を目的としたプリオン蛋白質構造変換改変による構造変換機序解析に関する研究

分担研究者 堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科

研究協力者 西村有起 (東北大学大学院医学系研究科)

研究要旨 プリオンの複製増殖に關与する補助因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞を用いて RNA 干渉による遺伝子スクリーニングを行った。217 個の遺伝子の 1 次解析を終了し、2 次、3 次解析により候補となる 8 個の遺伝子を同定した。

A. 研究目的

プリオンすなわち異常型プリオン蛋白質の複製増殖の機構は未だ解明されておらず、そのためより有効な早期診断法や治療法の開発が遅れている。そこで、本年度はプリオンの複製増殖に關与する補助因子の同定をめざして、RNA 干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いて候補因子の探索を行った。

B. 研究方法

1. siRNA 発現ベクターの作製

プリオン蛋白質に結合する分子、細胞表面に発現する分子を標的にし、それぞれの遺伝子に特異的な配列 21 塩基を選択した。選択配列のセンス配列とアンチセンス配列の間にループ配列を挿入し、さらに 3' と 5' 末端側に制限酵素配列を付けた二本鎖オリゴ DNA を作製した。DNA を siRNA 発現用ベクターに組み込み、siRNA 発現コンストラクトを得た。

2. プリオン持続感染細胞への遺伝子導入

異常型プリオン蛋白質を持続的に発現しているマウス神経芽細胞種細胞 ScN2a(RML)、N167(22L)を 10%で 6 穴ディッシュに植継ぎ、翌日に発現ベクター 0.5 µg /穴を細胞に導入した。導入後 12 時間後に培地中の血清濃度を 15%にし、導入から 3 日間培養した。

3. 異常型プリオン蛋白質の検出

培養後の細胞を溶解し、溶解液に Proteinase K 10 µg/ml を加えて 37°C で消化したものを SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写した。プリオン蛋白質の検出は SAF83 抗体 (SPIbio) を用いた化学発光法 (CDP-star, GE ヘルスケアバイオサイ

エンス) で行い、X 線フィルムに感光した。得られたイメージは NIH Image を用いて数値化し、ベクターのみを導入した細胞 (mock) での異常型プリオン蛋白質の発現を 100%とした相対比較を行った。

4. 標的遺伝子の半定量的発現解析

細胞に 0.5 ml ISOGEN (ニッポンジーン) を加えて全 RNA を抽出し、SuperScript II (インビトロジェン) を用いて random hexamers による cDNA の合成を行い、Platinum SYBER Green qPCR Supermix-UDG (インビトロジェン) を用いたリアルタイム PCR (ABI7300 Real Time PCR System、アプライドバイオシステムズ) で各 mRNA の発現量の解析を行った。発現量は内在性コントロール (β -actin) により補正を行い、mock を 100%とした比較 Ct 法による相対定量で行った。反応に用いた各プライマーのデザインは ABI7300 に付属の Primer Express (アプライドバイオシステムズ) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

マウスプリオン蛋白質遺伝子の発現抑制効果が確かめられている 21 塩基配列 (GGGCCTGGTGGCTACATGCT; Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305 (3):548-51.) を用いた異常型プリオン蛋白質の発現抑制をポジティブコントロール (PrPsi) とした。遺伝子導入 72 時間後の結果では、ベクターのみ (mock) ではプリオン蛋白質が発現しているの

に対し、PrPsi では総プリオン蛋白量では約 60%、異常型プリオン蛋白量では約 80%の発現抑制効果が認められた。この時のプリオン蛋白の mRNA 量は約 90%抑制されていた。

マウス神経芽細胞種細胞に RML 株が持続感染している ScN2a で行った 1 次スクリーニングではウェスタンブロット法で異常型プリオン蛋白発現量が増減 30%以上のものを異常型プリオン蛋白産生関連因子候補とした。現在までに 217 遺伝子を検索した結果、30 遺伝子で異常型プリオン蛋白発現に変動が認められた。

2 次スクリーニングでは 1 次スクリーニングで得られた 30 遺伝子についてウェスタンブロット法での評価の他に標的遺伝子の発現量を検討し、RNA 干渉効果の評価を行った。結果、標的遺伝子の発現抑制の結果であると考えられる 11 遺伝子が同定できた。

3 次スクリーニングとして現在、同じマウス神経芽細胞種細胞に 22L 株が持続感染している N167 細胞を用いたプリオン株の違いによる検討を行っている。異常型プリオン蛋白発現量と総プリオン蛋白発現量をウェスタンブロット法で、標的遺伝子とプリオン蛋白遺伝子の発現量を RT-PCR で検討している。その結果、ScN2a と N167 で共通して 8 遺伝子で異常型プリオン蛋白発現変動が認められた。

D. 考 察

同定した 8 種類の中には異常型プリオン蛋白発現量にのみ減少が見られ、細胞の総プリオン蛋白発現量には変動が見られないものがあった。このような候補因子は異常型プリオン蛋白産生過程に作用している可能性が高いと示唆された。一方、細胞の総プリオン蛋白発現量、異常型プリオン蛋白発現量ともに減少が認められるものもあり、これらは正常型プリオン蛋白発現に直接関係しているのではないかと推測された。

今回発見した異常型プリオン蛋白の発現量に影響を与える遺伝子産物は、細胞接着関連が 2、神経系発達関連が 1、脂質代謝関連が 1、蛋白質代謝関連が 1、シグナル伝達系などが 3 の計 8 個であった。いずれも神経細胞特異的に発現している分子ではなく、ほぼどの細胞にも共通して発現している分子であった。異常型プリ

オン蛋白の感染には感染因子となる異常型と正常型プリオン蛋白との接触が必要だと考えられており、異常型プリオン蛋白の複製増殖に関与する因子としては細胞接着関連因子などが候補である可能性がある。さらに異常型プリオン蛋白と接触することにより、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。また、プリオン蛋白は細胞膜ラフトで異常型への変換反応が起こっていると考えられており、ラフトの構成成分であるコレステロールに関連したものも候補と考えられる。今回同定した 8 個の遺伝子はこれらの推測に合致する分子であり、候補分子との関連については今後解析を進めていく予定である。また、これらの遺伝子産物が、診断マーカーや治療のターゲット分子となりえるかどうかについても検討を進めていく。

E. 結 論

プリオンの複製増殖に関与する補助因子を探索し、候補として 8 個の遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull*, 2006. (in press)
- 2) Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K: Treatment options in patients with prion disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate. In: *Prions-Food and Drug Safety*. (ed. Kitamoto T) Springer pp.41-66, 2005.
- 3) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O'Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis* 50:394-396, 2005.
- 4) Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI

in familial Creutzfeldt-Jacob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci* 232:45-49, 2005.

- 5) Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:80-87, 2005.
- 6) 逆瀬川裕二、堂浦克美：プリオン病の治療法の現状. *医学のあゆみ* 215:901-905, 2005.
- 7) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療－ペントサンポリサルフェートの脳室内持続投与－. *神経内科* 63:441-445, 2005.
- 8) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：プリオン病の治療－経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与方法の現状. *Brain Med* 17:259-264, 2005.

2. 学会発表

- 1) 堂浦克美：プリオン病治療法の開発. 第7回生命化学研究会シンポジウム（仙台）2005年1月
- 2) 逆瀬川裕二、渡辺光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：リコンビナントプリオン蛋白質を用いた蛋白質 unfolding 因子の探索. 2005年プリオン研究会（天童）2005年8月
- 3) 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：CJDの新しい治療法の試み－ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与. 2005年プリオン研究会（天童）2005年8月
- 4) 照屋健太、堂浦克美：GPI アンカー型プリオン蛋白質アナログの調製. 2005年プリオン研究会（天童）2005年8月
- 5) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Amyloid imaging probes for detection of prion plaques and treatment of prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, Hitachi Global Storage Technologies, San Jose (CA), USA, November, 2005.
- 6) 逆瀬川裕二、渡邊光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：The ATP-bound form of Hsp90 can

unfold recombinant prion protein. 第28回日本分子生物学会年会（大阪）2005年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 堂浦克美：プリオン病発症予防剤とそれを含む食品添加剤及び飼料添加剤. 特願2005-51999、2005年2月25日
- 2) 堂浦克美、岡周作、弘田量二、角田正也：哺乳動物組織材料の前処理方法. 特願2005-293011、2005年10月5日

16. プリオン蛋白質の立体構造変換因子に関する研究

分担研究者 金子 清俊 東京医科大学生理学第二講座

研究協力者 八谷如美 (東京医科大学・生理学第二講座)

山河芳夫 (国立感染症研究所・細胞化学部)

研究要旨 我々は新規クラスの分子シャペロン (Unfoldin) を同定した。Unfoldin は、プリオンをはじめとする異常凝集蛋白質に対しても、類を見ないほどの高度の解きほぐし活性を発揮する。実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能を検討するために、モデル系としてまずピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた検討を行った。レーザーマイクロダイセクターでピック小体を単離回収し、ウエスタンブロット法における抗体との反応性を指標として検討した結果、Unfoldin はサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を 1,000 倍以上改善した。BSE 脳を用いた preliminary な検討でも、BSE プリオン検出感度の大幅な向上が認められた。

A. 研究目的

プリオン病の原因であるプリオン蛋白質 (PrP) には正常型 (PrP^C) と異常感染型 (PrP^{Sc}) とが存在し、両者のアミノ酸配列は相同だが立体構造は大きく異なる。PrP^C は、異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) を鋳型とした PrP^C から PrP^{Sc} への高次構造変換がその基盤にあると考えられている。生体内における PrP^C の分解経路において、PrP^C はその中心領域で最初の分解を受けることが知られている。この部分は、PrP^{Sc} への変換に際しても critical な領域に相当するため、分解を受けるか変換されるかという相補的な関係にある。この部分は非常に疎水性に富んでいるため、分解酵素がアクセスするにはこの領域が解きほぐされる必要があると推察されるが、このことは PrP^{Sc} への変換に関与する分子シャペロン様分子との相同性も注目される。

これらの解きほぐし活性は正常に巻かれた分子 (PrP^C) を標的の分子と考えると考えられるため、従来から知られている異常凝集蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。そこで我々は、このような正常分子に対し解きほぐし活性を発揮する新規分子シャペロンが実際に存在するかどうかを、まず出芽酵母の系において検討し、Unfoldin を同定した。

Unfoldin の分子量は 58 キロダルトンで、試験管内で蛋白質の高次構造をほぐす活性から Unfoldin と命名した。Unfoldin を高純度に精製し電子顕微鏡を用いて一分子の形態を低角度回転蒸着法により観察したところ、直径約 10 nm、中央に約 2 nm のホールを持つリング状構造が観察された。Unfoldin の解きほぐし活性は ATP 依存性であり、また解きほぐし活性には基質特異性がなく、ATP 存在下では調べた限りすべての基質に結合しその高次構造を解きほぐした。さらに Unfoldin は、プリオン蛋白質、アミロイドベータペプチド (1-42)、アルファシヌクレインなどの異常凝集体の高次構造を試験管内で解きほぐした。

本年度は実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能を検討した。検討材料として、ピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた後に、BSE 感染脳からの BSE プリオンの検出も試みた。

B. 研究方法

2 検体、3 領域の孤発性 Pick 病剖検脳組織の凍結切片 (5 ミクロン厚) から、まず抗リン酸化 tau 抗体 (AT8) による免疫染色にて Pick 小体を同定し、レーザーマイクロダイセクション法を用いて Pick 小体を単離・回収した。Pick 小体を構成するリン酸化 tau

の分子種の解析を行なうために、回収した Pick 小体を SDS-PAGE にて分離した後、抗リン酸化 tau 抗体 (AT8 及び AT100) を用いたイムノブロッティングを行った。脳組織切片からの Sarkosyl 不溶性分画は、定法により回収した。

Unfoldin による回収した Pick 小体の解きほぐし処理は、既に報告した方法により行った。

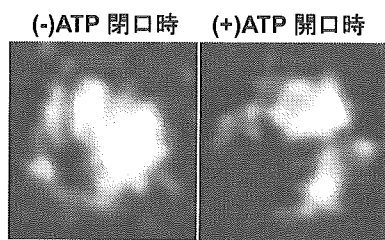
(倫理面への配慮)

本実験において用いたヒト剖検試料の取り扱いに関しては、国立精神・神経センター及び東京医科大学の倫理規定に従った。

C. 研究結果

実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能力を検討するために、ピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた検討を行った。そのために、疾患由来の細胞内封入体を、レーザーマイクロカッターと光学顕微鏡を組み合わせた独自のシステムにより周辺組織の混入なく高純度に単離・回収する系を構築した。

また、図 1 に出芽酵母から同定した強力な蛋白質解きほぐし作用を有するシャペロン様蛋白質; Unfoldin の構造を示す。

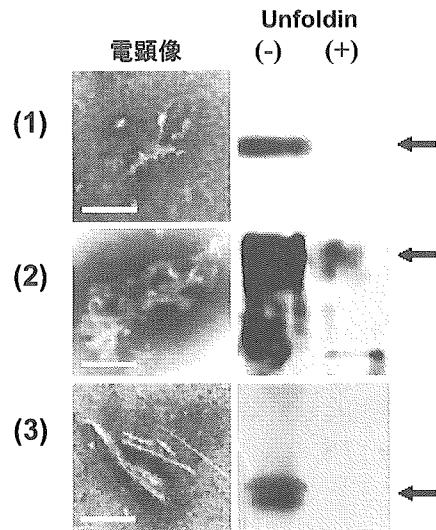


(図1: Unfoldinの低角度回転蒸着法による電子顕微鏡写真。)

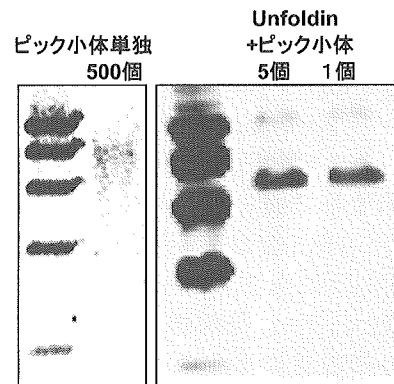
Unfoldin は、試験管内でβ型プリオン蛋白質、アルツハイマー病に関わるアミロイド β ペプチド(1-42)、パーキンソン病に関わる α-シヌクレインなどの異常凝集蛋白質を ATP 依存性に効果的に解きほぐし、これらのトリプシン感受性を上昇させた (図 2)。

次にピック病の脳内に蓄積するピック小体を Unfoldin 処理後にウエスタンブロット法により検討した結果、古典的な処理では単離した 500 個のピック小体を用いても異常リン酸化

タウシグナルの検出が困難であったが、Unfoldin 処理後には、わずか数個若しくは1個のピック小体によって単一のタウシグナルを鮮明に検出できた (図 3)。



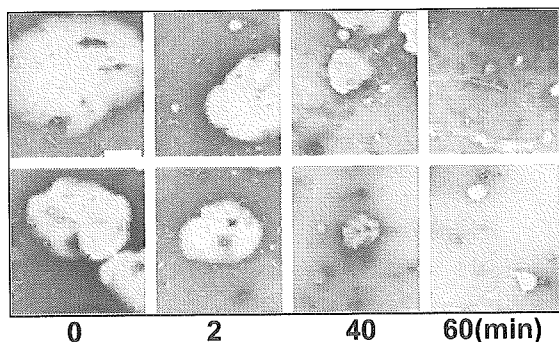
(図 2: Unfoldin による高度の解きほぐし活性。左パネル; 難溶性蛋白質の電顕像。右パネル; Unfoldin との反応後、難溶性蛋白質であるβ型プリオン蛋白質(1)、α-シヌクレイン(2)、アミロイドβペプチド(3) が低濃度トリプシン(200 ng/ml)で容易に分解されている。スケールバー: 10 nm)



(図3: Unfoldinによるウエスタンブロット法検出感度の著明な改善)

すなわち、Unfoldin はサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を 500 倍以上改善した。電子顕微鏡観察でも同様に、経時的なピック小体の解きほぐし像が得られた (図 4)。

現在、BSE 脳を用いた検討を行っている。



(図4: Unfoldinによるピック小体解きほぐしの電顕像。
スケールバー: 4 μm)

D. 考 察

Unfoldin は試験管内での基質特異性が認められずに、高度の解きほぐし活性を有していることが従来の我々の研究で明らかとなっていたが、この活性が実際の脳内沈着物に対しても有効であることが実証された。

実際の応用例として、BSE プリオンを含む高凝集性蛋白質のウエスタンブロットによる検出感度を、Unfoldin 処理により大幅に改善できる可能性が示唆される。

また、プロテオーム解析の主役は、液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS/MS) の組み合わせであるが、試料調整の段階において、対象となる生体細胞・組織の構成タンパク質群の難溶性、高凝集性が大きな課題となっている。従って、異常凝集体に限らず、膜蛋白質を多く含む解析試料を Unfoldin により事前処理することで、この問題の改善につながるかもしれない。

E. 結 論

Unfoldin は実際に生体内凝集体に対する解きほぐし能を有することが確認された。これにより、BSE プリオンを含む異常凝集蛋白質の抗原抗体反応による検出感度を大幅に改善できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka

A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K: Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neurosci Lett* 2005, 374:98-103.

- 2) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K: Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 327:894-899.
- 3) Tamura Y, Sakasegawa Y, Omi K, Kishida H, Asada T, Kimura H, Tokunaga K, Hachiya NS, Kaneko K, Hohjoh H: Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 2005, 379:149-151.
- 4) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue. *Nucleic Acids Symposium Series* 2005, 49:357-358.
- 5) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K: More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2. *Anal Biochem* 2005, 347:106-111.
- 6) Omi K, Hachiya NS, Tokunaga K, Kaneko K: siRNA-mediated inhibition of endogenous Huntington disease gene expression induces an aberrant configuration of the ER network *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 338:1229-1235.
- 7) Kaneko K, Hachiya NS: Hypothesis: Gut as source of motor neuron toxin in the development of ALS. *Med Hypotheses* 2006, 66:438-439.
- 8) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa

- H, Hachiya NS, Kaneko K. Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. *Amyloid*. (in press)
- 9) 金子清俊：クロイツフェルト・ヤコブ病。臨床と微生物 32:69-72, 2005.
 - 10) 八谷如美、金子清俊：新しいシャペロンの発見－神経難病の治療へ－。科学 75:283-285, 2005.
 - 11) 八谷如美、金子清俊：プリオン研究の進展。VIRUS REPORT 2:14-19, 2005.
 - 12) 金子清俊：vCJD (変異型クロイツフェルト・ヤコブ病)。日本評論社「からだの科学」244:95, 2005.
 - 13) 金子清俊：BSEと食の安全。日本薬剤師会雑誌 57:81-84, 2005.
 - 14) 金子清俊：科学と行政－科学者とBSE対策－。現代化学 416:60-63, 2005.
 - 15) 八谷如美、金子清俊：プリオン病の現状－牛海綿状脳症と変異型CJDを中心に－。LABIO 21 22:5-10, 2005.
 - 16) 金子清俊：プリオン病に挑むアンフォルジン。東京医科大学雑誌 63:443-449, 2005.
 - 17) 八谷如美、金子清俊：牛海綿状脳症(BSE)と変異型CJD。Bios 10:7-8, 2005.
 - 18) 金子清俊：特集「プリオン病」。はじめに。医学のあゆみ 215:875, 2005.
 - 19) 金子清俊：理系の説明責任。BSE問題をめぐって。科学 76:52-55, 2006.
 - 20) 八谷如美、金子清俊：プリオン蛋白質異常化の分子機構。化学療法の領域 22:63-68, 2006.
 - 21) 八谷如美、金子清俊：プリオン病の治療－現状と将来展望－。Annual Review2005 神経 (柳沢信夫、篠原幸人、岩田 誠、清水輝夫、寺本明編)中外医学社、東京、4:90-95, 2005.
 - 22) 金子清俊：不思議なプリオン病。脳はどこまでわかったか。朝日選書771(井原康夫編)、朝日新聞社、東京、2005.
 - 23) 金子清俊：プリオン病。日常診療に活かす老年病ガイドブック－認知症・うつ・睡眠障害の診療の実際－。三木哲郎編、Medical View (東京) 4:173-179, 2005.
 - 24) 金子清俊：BSE－米国産牛肉輸入再開問題－。日本農業の動き。農政ジャーナリストの会編、農林統計協会、東京、153:58-79, 2005.
 - 25) 金子清俊：プリオンタンパク、プリオン遺伝子。医学大辞典、南山堂、東京 (印刷中)
2. 学会発表
- 1) Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, Kaneko K: Prion disease and Unfoldase chaperone:an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. 30th FEBS & 9th IUBMB Conference: The Protein World. Budapest, July, 2005.
 - 2) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. *In vitro* selection of DNA aptamers against proteins in tissue. Second World Congress on Synthetic Receptors. Zalzburg, September, 2005.
 - 3) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue. The 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC2005). Fukuoka, September, 2005.
 - 4) Kiyotoshi Kaneko. Diagnostic application of a novel protein unfolding chaperone (Unfoldin) in protein aggregation disorders. The 1st International Symposium on Geriatrics and Gerontology. Nagoya, November, 2005.
 - 5) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 45th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, December, 2005.
 - 6) 金子清俊：牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病。第59回日本栄養・食料学会大会(東京) 2005.5.
 - 7) 金子清俊：牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病。日本労働組合連合会(東京) 2005.6.
 - 8) 金子清俊：牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病。滋賀血液・免疫研究会(滋賀) 2005.7.

- | | |
|--|---|
| <p>9) <u>金子清俊</u>：牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 夏期学校給食学習会(横浜) 2005.8.</p> <p>10) <u>金子清俊</u>：牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 第二回柏崎認知症フォーラム(新潟) 2005.10.</p> <p>11) <u>金子清俊</u>：牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 第12回徳島神経難病治療薬研究会(徳島) 2005.10.</p> <p>12) <u>金子清俊</u>：プリオンと蛋白質凝集. 平成17年度新潟大学脳研究所神経内科同窓会懇話会、40周年記念講演会(新潟) 2005.11.</p> <p>13) 渡邊光太、<u>金子清俊</u>、八谷如美：正常型プリオン蛋白質の分化誘導下における輸送機構. 2005年プリオン研究会(山形) 2005.8.</p> <p>14) 小塚芳道、<u>金子清俊</u>、渡邊光太、八谷如美：Possible evidence of a missing link between prokaryotes and eukaryotes; Presence of subcellular membrane system in newly discovered marine microorganisms. 第78回日本生化学会大会(神戸) 2005.10.</p> <p>15) 小見和也、八谷如美、徳永勝士、<u>金子清俊</u>. Requirement of huntingtin in the maintenance of endoplasmic reticulum morphology. 第78回日本生化学会大会(神戸) 2005.10.</p> <p>16) 八谷如美、渡邊光太、逆瀬川裕二、<u>金子清俊</u>. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. 第78回日本生化学会大会(神戸) 2005.10.</p> <p>17) 八谷如美、大久保卓哉、小塚芳道、逆瀬川裕二、<u>金子清俊</u>：Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by Unfoldin/oligomeric Aip2p. 第78回日本生化学会大会(神戸) 2005.10.</p> <p>18) 大久保卓哉、逆瀬川裕二、有馬邦正、山田光則、水澤英洋、八谷如美、<u>金子清俊</u>：ピック小体の主要構成蛋白は異常リン酸化タウ 69kDa である. 第28回日本分子生物学会年会(福岡) 2005.12.</p> | <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> |
|--|---|

H. 知的財産権の出願・登録状況

17. 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 鈴木 達夫 東京都芝浦食肉衛生検査所長

研究要旨 と畜場における牛海綿状脳症対策は、消費者の安全・安心に直接影響するため、より高度なリスク排除の方法を常に研究、開発することが重要である。今回、脳・脊髄組織による枝肉等の汚染防止対策の構築を目的にグリア繊維性酸性タンパク（GFAP）を用いた枝肉汚染状況の把握と汚染除去方法の検討及びピッシングに替わる不動化法の検討を行った。さらに、BSE 実験感染が認められた舌扁桃に関する調査を実施した。枝肉汚染状況把握とその除去対策については、枝肉処理方法や部位による汚染状況を考慮した方法を実施することで、脳脊髄組織汚染を防御できた。不動化法については、代替法として試行した電気による不動化はピッシングよりやや強度が劣るが、その特性を考慮し、と畜場の設備やと畜方法を工夫して使用すれば、導入に問題はないと考えられた。舌扁桃調査では分布しないとされていた最終有郭乳頭から舌尖部にもその存在が確認された。また、舌扁桃の除去は粘膜固有層を除去することで可能であることを検証した。

研究協力機関および協力研究者：

栃木県北食肉衛生検査所	高岩澄夫
群馬県中央食肉衛生検査所	信澤敏夫
群馬県北部食肉衛生検査所	糸井泰博
埼玉県中央食肉衛生検査センター	平井 茂
さいたま市食肉衛生検査所	長谷部浩三
千葉県東総食肉衛生検査所	平山勝男
横浜市食肉衛生検査所	森島保男
長野県上田食肉衛生検査所	佐藤彰一郎
大阪市食肉衛生検査所	坂谷真郎
宮崎県小林食肉衛生検査所	湯地信夫
鹿児島県末吉食肉衛生検査所	特手洋美
東京都芝浦食肉衛生検査所	
八王子支所	村松 哲

検査対象を 21 ヶ月齢以上とすることで見直しを行った。これは現在の SRM（特定部位）除去措置を変更しなければ、検査対象年齢を限定しても vCJD のリスクが増加することはないと考えられることによる。そのため、と畜場では引き続き適正な SRM 除去、交差汚染防止、その実施状況の定期的検証等を確実に実施していく責務がある。と畜場で解体処理された牛枝肉の脳・脊髄による汚染は、不十分な洗浄では汚染は除去されないことがある。そのため、洗浄方法について標準作業手順書等の遵守状況及び改善状況についてさらに詳細に調査するとともに、洗浄方法を改善すること等による汚染の除去効果を検証し、牛枝肉等に脳・脊髄組織が残留しない処理方法を検討した。

また、背割りや脊髄除去作業従事者や取扱器具等から枝肉への二次汚染が考えられるため、従事者への飛散状況及び器具の汚染状況調査を行い汚染実態を把握することで、汚染防止のための処理方法の検討の一助とした。

I. 脳・脊髄組織汚染状況調査及び汚染除去方法の検討

A. 研究目的

平成 17 年 5 月 6 日、内閣府食品安全委員会から BSE 国内対策の見直しについての答申（「我が国における牛海綿状脳症（BSE）対策に係る食品健康影響評価」）が出された。これに基づき、厚生労働省は、と畜場における BSE

B. 研究方法

1. 牛枝肉における脳・脊髄組織汚染防止のための処理方法の検討
と畜場でとさつ解体された牛枝肉について、

表1 牛枝肉拭取り検体

調査報告機関	通常	追加洗浄策									計
		手動通常圧	手動高圧	手動高圧及び手動通常圧	バキューム	脊柱付近洗浄	手動高圧短縮20秒	手動高圧短縮15秒	手動高圧延長20秒	水洗手洗延長	
A	5	5	5	5							20
B	5				5						10
C	5		5								10
D	5		5			5					15
E	5										5
F	5									5	10
G	5						5	5	5		20
H	9	5									14
I	5	5	5	5							20
計	49	15	20	10	5	5	5	5	5	5	124

中枢神経系組織の細胞マーカーであるグリア繊維性酸性タンパク（GFAP：Glial Fibrillary Acidic Protein）の残留量を測定することにより、洗浄による脳・脊髄組織汚染の改善効果を比較調査した。GFAPの測定はRIDASCREEN Risk Material 10/5（R-Biopharm社製）を用いた。ふき取りは、背割り直後（洗浄前）及び洗浄を含む全ての作業工程が終了した直後（洗浄後）とし、乾燥滅菌綿棒で濡れた状態の枝肉表面をふき取った。ふき取り部位は、背割り面（内側）の第三頸椎周囲、最後胸椎周囲、胸腔背側、内側前肢及び剥皮面（外側）の外側腹部の計5か所とし、すべて同じ側の枝肉で、同じ部位の骨以外の筋肉又は脂肪100 cm²を洗浄前後に各々ふき取った。改善方法は、手動洗浄の追加・時間延長等の各機関で可能な方法を実施し、通常洗浄処理方法と比較してGFAP汚染除去効果を検討した。この調査は9カ所のと畜場で行い、検査枝肉数は、通常処理方法5頭に加え各改善策ごとに5頭とし、その他必要な調査を行い、通常及び改善策で114頭、その他比較対象として10頭計124頭実施した（表1）。なお、GFAP検出限界値は、100 cm²あたり3ngである。

2. 作業員への脳・脊髄組織飛散状況及び器具の取扱状況調査

背割りや脊髄除去作業従事者への脳・脊髄組織飛散状況を調査するため、フェイスガードや前掛け、手袋等の防護装備、また背割ノコギリ等の器具の使用後の洗浄前後をふき取り、1と同様にGFAP残留量を測定した。ふき取りは、乾燥滅菌綿棒でふき取ったが、表面が乾燥しているものをふき取る場合は、滅菌生理食塩水で

湿らせた滅菌綿棒で行った。検査数は、防護装備を199検体、背割ノコギリの洗浄前後を各106検体、計411検体実施した（表2）。

表2 作業員への脳・脊髄組織飛散状況及び器具の取り扱い状況

	背割 (検体数)		計
	洗浄前	洗浄後	
背割ノコギリ	76	76	152
背割ノコギリ(刃)	10	10	20
背割ノコギリ(カバー)	20	20	40
計	106	106	212

	防護装備 (検体数)		計
	洗浄前	洗浄後	
フェイスガード	15		15
ヘルメット	6		6
ゴーグル	10		10
作業服	9		9
手袋	84		84
ナイフ	15		15
前掛け	60		60
計	199		199

C. 研究結果

1. 牛枝肉における脳・脊髄組織汚染防止のための処理方法の検討

GFAP残留状況は、GFAP残留度で示した。GFAP残留度は厚生労働省の通知に基づき、GFAP残留量3ng未満/100 cm²をGFAP残留度0に、3ng以上6ng未満/100 cm²を1に、6ng以上9ng未満/100 cm²を2に、9ng以上12ng未満/100 cm²を3に、12ng以上/100 cm²を4として換算した。

洗浄前の枝肉は、頸椎周囲、胸椎周囲でGFAP残留度が高く、特に、頸椎周囲、胸椎周囲において、残留度4以上の高い値が多かった。また、

胸腔背側、内側前肢においても残留が認められたが、外側腹部は、すべて残留度0であった(表3)。洗浄前に残留度1以上が認められた検体における通常洗浄の洗浄効果については洗浄後に残留度1以上を示した検体は、洗浄前に比べ13.8%に減少した。同様に洗浄改善策を実施した場合については残留度1以上を示した検体は9.4%に減少した(表4)。

表3 と畜場における牛枝肉のGFAP残留状況(洗浄前)

GFAP 残留度	(検体数)					計
	頸椎 周囲	胸椎 周囲	胸腔 背側	内側 前肢	外側 腹部	
0	79	60	111	113	114	477
1	14	11	3	0	0	28
2	9	8	0	1	0	18
3	4	5	0	0	0	9
4	8	30	0	0	0	38
計	114	114	114	114	114	570

※ GFAP 残留度について
 3ng 未満/100 cm² 0
 3ng 以上 6ng 未満/100 cm² 1
 6ng 以上 9ng 未満/100 cm² 2
 9ng 以上 12ng 未満/100 cm² 3
 12ng 以上/100 cm² 4

表4 洗浄前にGFAP残留度1以上の検体における洗浄効果

GFAP 残留度	洗浄前 (%)	通常洗浄後 (%)	改善洗浄後 (%)
0		25(86.2)	58(90.6)
1	28(27.9)	3(10.3)	5(7.8)
2	18(21.5)	0(0.0)	1(1.6)
3	9(7.6)	0(0.0)	0(0.0)
4	38(43.0)	1(3.5)	0(0.0)
計	93(100)	29(100)	64(100)

洗浄後における GFAP 残留度は、通常の洗浄方法に対して改善方法を実施した方が残留度が低かった(図1)。また洗浄方法別では通常圧のみで洗浄するよりも高圧洗浄もしくはこれらを併用した方が低く、スチーム/バキュームを追加実施した場合は全て残留度0であった(表5)。

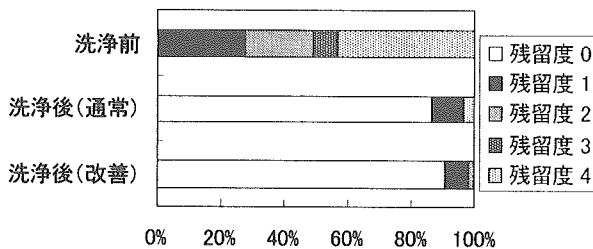


図1 洗浄前にGFAP残留度1以上の検体における洗浄効果の階級別構成割合

表5 洗浄後における洗浄方法別のGFAP残留度の階級別構成割合

GFAP 残留度	(%)				
	通常	手動 通常圧	手動 高圧	手動高圧 及び手動 通常圧	バキュー ーム
0	98.37	98.40	97.60	98.00	100
1	1.22	0.80	2.40	2.00	0
2	0	0.80	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0.41	0	0	0	0

各と畜場別の洗浄効果をGFAP残留度の階級別構成割合で示す。

Aと畜場では、通常の洗浄に対して、改善方法として手動通常圧洗浄の追加、手動高圧洗浄の追加、手動通常圧及び高圧洗浄の追加を実施したところ、改善方法実施後では残留度1以上を示すものは無くなった。肉眼的にも、自動高圧洗浄機のみではノコ屑が残留することがあるが、手動洗浄の過程で除去されることが確認できた(表6)。

表6 Aと畜場における枝肉のGFAP残留度の階級別構成割合

GFAP 残留度	(%)							
	A と畜場 通常		+手動 通常圧		+手動 高圧		+手動通常圧 +手動高圧	
	洗浄 前	洗浄 後	洗浄 前	洗浄 後	洗浄 前	洗浄 後	洗浄 前	洗浄 後
0	76	96	72	100	96	100	72	100
1	4	4	4	0	4	0	16	0
2	8	0	16	0	0	0	8	0
3	0	0	4	0	0	0	0	0
4	12	0	4	0	0	0	4	0

Iと畜場でも同様な改善方法を実施したが、洗浄前の残留度が高い場合では残留度0にすることはできないものがあつた(表7)。

表7 Iと畜場における枝肉のGFAP残留度の階級別構成割合

GFAP 残留度	(%)							
	I と畜場 通常		+手動 通常圧		+手動高圧		+手動通常圧 +手動高圧	
	洗浄 前	洗浄 後	洗浄 前	洗浄 後	洗浄 前	洗浄 後	洗浄 前	洗浄 後
0	80	96	88	92	88	92	68	96
1	0	4	0	8	0	8	16	4
2	4	0	0	0	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0	0	4	0
4	12	0	12	0	12	0	12	0

Bと畜場では、最終洗浄前にスチームバキュームにより背割りで発生したノコ屑の確実な除去を実施した。通常洗浄及び改善方法いずれの場合も残留度0であった(表8)。

表8 Bと畜場における枝肉のGFAP残留度の階級別構成割合

B と畜場	通常		+バキューム	
	GFAP 残留度	洗浄前	洗浄後	洗浄前
0	88	100	64	100
1	0	0	12	0
2	4	0	4	0
3	4	0	4	0
4	4	0	16	0

Fと畜場では、背割りを正中線をずらして実施している。洗浄前で残留度1以上を示すものが認められたが、洗浄後では残留度0であった(表9)。

表9 Fと畜場における枝肉のGFAP残留度の階級別構成割合

F と畜場	通常		+手動高圧	
	GFAP 残留度	洗浄前	洗浄後	洗浄前
0	96	100	96	100
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	4	0	4	0

Gと畜場では、通常洗浄に対して、洗浄時間の短縮及び延長効果を比較した。短縮した場合、通常よりも残留度が高かったが、延長すると残留度0を超えるものは無くなった(表10)。

表10 Gと畜場における枝肉のGFAP残留度の階級別構成割合

G と畜場	通常(40秒)		+手動高圧 (短縮15秒)		+手動高圧 (短縮20秒)		+手動高圧 (延長60秒)	
	GFAP 残留度	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前
0	92	100	88	88	96	96	100	100
1	8	0	4	4	4	4	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	8	8	0	0	0	0

その他C・D・E・F・Hと畜場においては通常の洗浄方法で残留度0であり、手動通常圧や手動高圧洗浄の追加の改善方法を実施したところ残留度0であった。

洗浄方法について標準作業手順書等の遵守状況及び改善状況について調査した結果、標準作業手順書はほぼ整備されている(8と畜場)。

また作業書に基づく洗浄方法の遵守状況については全履行・一部を除く履行を合わせると、ほぼ遵守されている(8と畜場)。枝肉へのGFAP残留対策として改善された内容は、脊柱周辺の予備洗浄や洗浄時間の延長及び上から下への洗浄の徹底で改善項目は実施され遵守されている(D・Eと畜場の2と畜場)。

2. 作業者への脳・脊髄組織飛散状況及び器具の取扱状況調査

背割ノコギリのGFAP残留は、残留度1以上が洗浄前で106検体中16検体(15.1%)、洗浄後で106検体中2検体(1.8%)検出された(表11)。

表11 背割ノコギリのGFAP残留度の階級別構成割合

GFAP 残留度	背割ノコギリ	
	洗浄前	洗浄後
0	84.9	98.2
1	5.7	0.9
2	4.7	0
3	3.8	0
4	0.9	0.9
1以上	15.1	1.8

また、背割り従事者等へのGFAP飛散状況は、残留度1以上がナイフ15検体中4検体(26.6%)、手袋84検体中5検体(6.0%)、前掛け60検体中3検体(4.9%)検出され、作業服・ゴーグル・ヘルメット・フェイスガード計40検体からは検出されなかった(表12)。

表12 作業員装備のGFAP残留度の階級別構成割合

GFAP 残留度	作業員装備						
	ナイフ	手袋	前掛け	作業服	ヘルメット	ゴーグル	フェイスガード
0	73.4	94.0	94.9	100	100	100	100
1	13.3	1.2	1.7	0	0	0	0
2	13.3	0	1.7	0	0	0	0
3	0	0	1.7	0	0	0	0
4	0	4.8	0	0	0	0	0
1以上	26.6	6.0	5.1	0	0	0	0

D. 考 察

1. 牛枝肉の脳・脊髄組織汚染防止の処理方法の改善効果

昨年度までの本分担研究の結果と同様に、洗浄前の枝肉のGFAP残留状況は、特に頸椎周囲、胸椎周囲において高い値を示したことにより、

これらが最も汚染されやすい部位であることが再度確認された。本年度追加したふき取り部位として、胸腔背側、内側前肢においても残留が認められたことは、背割りによる直接の断面以外でも背割面周囲では二次的な汚染を受けていると考えられる。また、枝肉の洗浄効果についても昨年度までの研究結果と同様に GFAP 残留量の減少が確認されたが、通常洗浄方法よりも改善策を実施した方が洗浄効果は高いと考えられる。しかし、と畜場ごとに、洗浄方法とその効果に違いがあり、通常洗浄でも残留が認められない施設から、改善策を実施しても残留する施設があることが判明した。

洗浄方法別の洗浄効果については、手動高圧洗浄を追加実施すること、及び背割り面の脊髄周辺の汚染をスチームバキュームで確実に除去することで洗浄効果を上げられると考えられる。

各と畜場別の洗浄効果について検証すると、自動高圧洗浄機のみを使用している施設では、肉眼的にもノコ屑が確認されており、洗浄前の残留度が高いと十分な洗浄効果が得られない場合があることが確認された。このことは、自動洗浄機では、洗浄ノズルの位置や方向・洗浄時間が一定のため、牛枝肉の汚染の部位・度合いなど個体差に応じた洗浄ができないためと考えられる。手動高圧洗浄については、床から上に向けて洗浄するべきではなく、ある程度の高台から洗浄方向が下方になるようにして洗浄することで枝肉の洗浄効果を高め、隣接する枝肉や施設への二次汚染を減少させることができる。また、水圧については高圧であればよいというわけでもなく、汚染を拡散させない程度の水圧でなければならない。

洗浄時間の洗浄効果への影響は、通常洗浄で残留が認められていなくても、洗浄時間を短縮すると残留が認められるようになることから、洗浄時間を延長することは効果があると考えられる。

背割りを正中線からずらす方法は、脊柱管内腔部分を切断することにより、背割り後、脊髄硬膜ごと脊髄を除去できるようにすることができる。そのため、脊髄の付着を最小限にすることができる。しかし、非常に高度で精密な作業であるため、作業員の背割り技術の精度によ

り汚染率には大きな違いが出てくると考えられる。さらに作業時間が長くなれば、作業員への負担も大きくなり、脊髄を損傷する危険性も高くなる。この方法を実施している施設において、正中線をずらし脊髄硬膜を傷つけることなく背割りを行ったにもかかわらず、洗浄前の検体から GFAP が検出されたことから、正中線をずらすことにより背根神経節などを損傷した可能性も否定できない。この技術の導入は、作業員の十分な技術の研鑽と脊髄を損傷した場合を想定した適切な洗浄を怠らないことが必要である。また、正中線をずらすと脊椎による枝肉の支えが弱くなり、流通過程で自重により枝が伸びて格付けのランクが下がることもあるため、経済的損失があることも考慮しなければならない。

洗浄方法における標準作業手順書等の遵守状況及び改善状況から、適切な対策を実施すれば効果をあげられる。そのため、各と畜場ごとに整備された標準作業手順書の遵守の徹底ならびにその検証を定期的に行うべきである。GFAP の残留が認められた場合は、原因究明のため、各工程間のふき取り検査等を行い汚染除去・洗浄が不十分な工程の確認と対策を検討する必要がある。

2. 作業員への脳・脊髄組織飛散状況及び器具の取扱状況調査

背割りノコギリの洗浄については、ほぼ現在の方法で十分洗浄されていると考えられる。しかし、洗浄前のふき取り結果から GFAP の残留が認められており、洗浄が不十分であると残留することが考えられるため、1 頭毎に十分洗浄する必要がある。また直接脊髄に接触するナイフ・手袋等は汚染を免れないため、二次汚染を防ぐために 1 頭ごとに十分洗浄することが必要である。今回の結果からは検出されなかったものの背割り従事者等への飛散状況からみて、フェイスガード等の防護対策も必要であると考えられる。

器具などの洗浄が不十分であると二次汚染が考えられるため、1 頭ごとの装備や器具の洗浄の徹底が、脳・脊髄組織による汚染を防ぐために重要であると考えられる。

E. 結 論

1. 牛を扱うと畜場においては、各と畜場ごとに整備された標準作業手順書の遵守の徹底ならびにその検証を定期的に行う。GFAP の残留が認められた場合は、原因究明のため、各工程間のふき取り検査等を行い、汚染除去・洗浄が不十分な工程の確認と対策を検討し改善する必要がある。

2. 脳・脊髄組織による汚染の要因であるノコ屑を、最終洗浄前にスチームバキューム等により完全に除去することで洗浄効果を高めることが可能である。

3. 手動高圧洗浄処理を追加または時間延長することは効果的である。しかし汚染された洗浄水で二次汚染が拡大しないよう洗浄方向や適度な水圧にするなどの注意が必要である。

4. 自動高圧洗浄機のみで洗浄している施設は、洗浄ノズルの位置や方向・洗浄時間が一定である。そのため、枝肉ごとに汚染度の個体差がある牛枝肉に対しては適切な洗浄部位や洗浄方向に対応することは困難である。

5. 脳・背髄組織による汚染を防止するには、枝肉の背割りを正中線からずらすことが、効果的である。しかし、非常に高度で精密な作業であるため、作業員の背割り技術の精度により汚染率には大きな違いが出てくると考えられることから、作業員に対し十分な技術の研鑽と脊髄を損傷した場合を想定した適切な洗浄を怠らないよう教育することが必要である。

6. 交差汚染防衛のために、背割ノコギリや直接脊髄に接触するナイフ・手袋等を1頭毎に十分洗浄することを徹底すること、また作業者の防護対策も必要である。

7. 適切な洗浄を実施することで汚染を検出限界値以下にすることは可能である。自主衛生管理責任の下、各と畜場ごとに実態に即した実現可能な処理方法を構築し、作業員の衛生意識と技術の向上ならびに定期的な検証が重要である。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 参考文献

[1] 道野英司：BSE 国内対策の見直しについて。

日獣会誌 58: 431-433, 2005.

- [2] 内閣府食品安全委員会：食品健康影響評価の結果の通知について（府食第459号）平成17年5月6日
- [3] 厚生労働省通知：平成17年度と畜場における枝肉の微生物汚染実態調査等について（食安監発第0428001号）17年4月28日
- [4] 分担研究者 沢谷広志：平成13年度厚生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」
- [5] 分担研究者 沢谷広志：平成14年度厚生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」
- [6] 分担研究者 佐々木裕之：平成15年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業担研究報告書「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」
- [7] 分担研究者 佐々木裕之：平成16年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業
- [8] 担研究報告書「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」

II. 舌扁桃調査

A. 研究目的

扁桃には、口蓋扁桃、咽頭扁桃、舌扁桃があり、英国において、口蓋扁桃に牛海綿状脳症（BSE）感染性が認められたという報告¹⁾から、頭部から舌を取り除く場合には、扁桃に接触しないよう除去する旨厚生労働省より通知されている²⁾。その後、舌扁桃についても適切な除去を指導するよう改めて厚生労働省より通知された³⁾。

舌扁桃は、口蓋及び咽頭扁桃と比べ肉眼では容易に判別できず、適切な除去方法について確立されていない。米国では、最も舌根部に近い有郭乳頭（以後「最終有郭乳頭」という。）を境とし、それより舌尖部には舌扁桃は存在しないとされ、最終有郭乳頭でカットして食用に供している⁴⁾。

一方最終有郭乳頭より舌尖部にも舌扁桃があるとされる報告もある⁵⁾。

そこで今回、舌扁桃について、最終有郭乳頭を境とした舌根部と舌尖部の舌扁桃の分布状況と、品種、性及び月齢による分布状況の差異を検索し、除去方法について検討した。

B. 研究方法

1. 舌扁桃の分布状況調査

(1) 調査期間

平成 17 年 9 月から平成 18 年 2 月

(2) 調査方法

ア 調査対象

と畜検査で合格となった舌を、6 研究協力機関において、1 機関 10 頭を目安に合計 63 頭分を調査に供した。和牛、交雑種、乳用種の種類別等の内訳は表 1、舌の重量、長さ等は表 2 のとおりである。

表1 種類別・性別・月齢別調査数

種類別	性別	月齢別		
和牛	24 牡	0	~20ヶ月	4
交雑種	11 牝	41	~30ヶ月	35
乳用種	28 去勢	22	30ヶ月以上	24

表2 調査した舌の概要

	平均	最大	最小
重量 (g)	1,785	2,800	1,200
長さ (mm)	309	350	255
幅 (mm)	81	110	60
厚 (mm)	88	120	62

イ 調査方法

舌の最終有郭乳頭を中心として、舌尖方面へ 5cm、舌根部方面は咽頭近くまで、深さは 2cm 程度を切り取り、ホルマリン固定した。2~3 日後、粘膜固有層及び筋層等を整形、再固定した。

最終有郭乳頭を中心に舌尖方面へ 5mm ずつ 3 箇所、舌根方面へ 5mm ずつ印をつけ、それぞれ、A、B、C、及びア、イ、ウ、エ、オ、カ、キ 7 箇所を区分けした（図 1）。

また、舌を中心線で切り離し、舌根部から舌尖部をみて右側をさらに二分割して、内側、外側とした（図 2）。

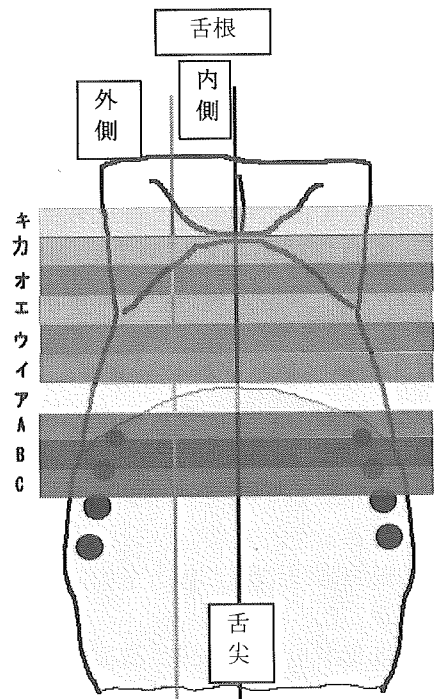


図1 調査区分

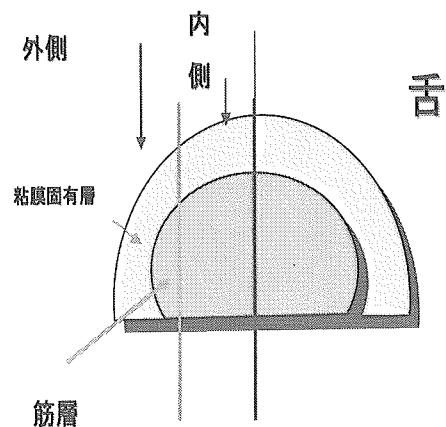


図2 舌横断面

A～C、ア～キの部位を5mm間隔で切り出し、1頭あたり約20箇所をパラフィン包埋し、ブロックを作成した。ブロックは舌尖の方を薄切面とした。Aブロックについては、舌尖に最も近い有郭乳頭の真中を薄切面とした。

1ブロックごとに1～3切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）後、鏡検し、粘膜固有層と筋層に分けて扁桃組織を確認した。

舌根部14ブロック（7ブロック×2）に扁桃組織が確認できなかった場合には、さらにク、ケと5mm間隔でブロックをつくり調査した。

一部の判定に苦慮した検体については、エラスチカ・ワンギーソン染色により判断基準となる繊維性被膜を確認し、扁桃組織の有無を確認した。

さらに63頭のうち4頭については、3頭は舌尖部に向かって有郭乳頭の全数が含まれるD区分からK区分まで、1頭は最舌尖（舌の先端）まで舌扁桃の有無を調べた。

ウ 舌扁桃の組織学的判断基準

下記の①から③を舌扁桃と判断した。なお、舌扁桃の組織学的判断については、1979 The Viscera of the Domestic Mammals p54-55 を参考とした。また、リンパ集簇の50%以上を繊維性被膜に囲まれるものについて舌扁桃と判断した。

- ①陰窩があり、周囲に繊維性被膜に覆われた二次濾胞を有する組織（図3）。
- ②陰窩はないが、繊維性被膜に覆われた、二次濾胞（図4）。
- ③繊維性被膜に囲まれたリンパ集簇（図5）。



図3①陰窩及び繊維性被膜に囲まれた二次濾胞

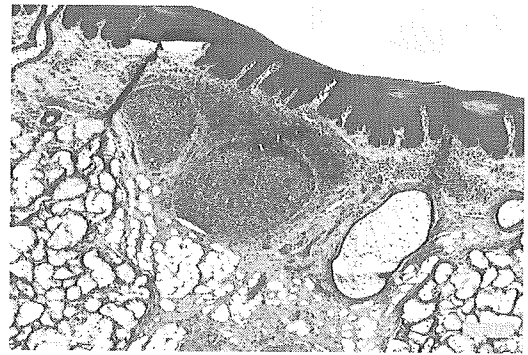


図4②陰窩がなく、繊維性被膜に囲まれた二次濾胞

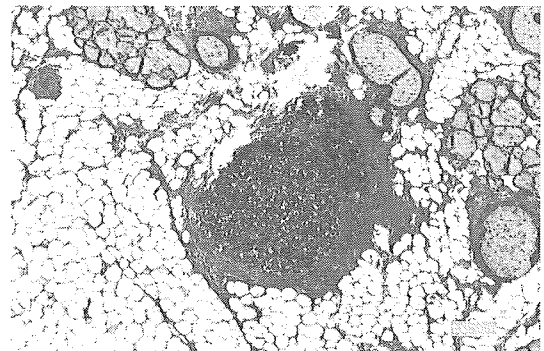


図5③繊維性被膜に囲まれたリンパ集簇

2. 舌扁桃の除去方法の検討

(1) 調査期間

平成18年1月から平成18年2月

(2) 調査方法

63頭とは別に、皮（粘膜固有層）を取り除くなど食用に供するために処理した舌（いわゆるムキ舌）15頭について、ホルマリン固定後、図1の区分のとおりA～C、ア～キに区分けして、ブロックを作成し、切片を作成してHE染色後鏡検し、舌扁桃の有無を調べた。15頭の概要は表3のとおりである。

表3 食用に処理した舌の調査数

種類別	性別		月齢別		
和牛	6	牡	0	～24ヶ月	4
交雑種	1	牝	9	～36ヶ月	6
乳用種	8	去勢	6	36ヶ月以上	5

C. 研究結果

1 舌扁桃の分布状況調査

(1) 最終有郭乳頭を境にA～C区分、ア～キ区分までの10区分における舌扁桃検出状況

ア 粘膜固有層における舌扁桃分布状況

A～C区分からア～キ区分までの10区分