

我が国における牛海绵状脳症（BSE）診断法の標準化に関する緊急研究

(H13年)

H13年度予算額：7,250千円

研究代表者：清水 実嗣 ((独)農業技術研究機構動物衛生研究所)

研究の目標・概要

1 目標

我が国における分析試料の採取・スクリーニング・輸送・保存時の取り扱いから始まる、一連のプリオニクス検査等生化学的および免疫組織学的BSE診断法の実施条件を緊急に標準化するとともに、と畜場での迅速検査法を開発。

本課題終了後の目標

確定診断に必要な留意事項等のマニュアル作成及びと畜場での迅速検査法の開発

- BSE脳材料の分析前処理条件の最適化
- 生化学的診断法に対する今回BSE患畜由来プリオンの反応特性解明
- 免疫組織学的診断法に適した抗体の選択
- 4時間以内の迅速検査

2 内容

脳材料の取り扱い法の最適化、分析用酵素、抗体の評価・選定による判定精度の一層の向上及びエライザ法の改良によると畜場でのスクリーニング検査の迅速化

3 新規性

9月10日我が国初発のBSE患畜確認に対する緊急対応である。

諸外国の現状等

1 現状

世界的に発病後の死亡材料についての確定診断法として、病理組織学的および免疫組織学的方法による診断と、異常プリオン蛋白質の検出を目的とするウェスタンプロット法やエライザ法など生化学的診断法が開発されているが、その判定に要する時間や精度と感度には一長一短があり、我が国で発生したBSEでの適用条件について検討する必要がある。

2 我が国の水準

動物のプリオン病に関する我が国の研究は、国内発生のあるヒツジのスケレイパーを対象として進められてきた。これらの研究において、ヒツジの異常プリオン蛋白質に対する各種特異抗体の作出、微量の異常プリオン蛋白質検出法であるイムノPCR法の開発をはじめ、それら開発手法を用いて異常プリオン蛋白質の体内分布を調べ扁桃の生検材料による生前診断法を開発している。

研究進展・成果がもたらす利点

1 世界との水準の関係

我が国初発のBSE患畜であり、英国を中心とする既往例と緊急に比較検討する必要がある。

2 波及効果

我が国における分析試料の採取・スクリーニング・輸送・保存時の取り扱いから始まる、一連のプリオニクス検査等の生化学的診断及び免疫病理学的診断法の実施条件を標準化するとともにと畜場における迅速検査が実用化されることにより、今後予定される本格的な検査開始において異常プリオンの検出がより一層包括的かつ確実なものとなり、食肉の安全性を確保できる。

我が国における牛海绵状脳症（BSE）診断法の標準化に関する緊急研究

(H13年)

H13年度予算額：7,250千円

研究代表者：清水 実嗣 ((独)農業技術研究機構動物衛生研究所)

研究の目標・概要

1 目標

我が国における分析試料の採取・スクリーニング・輸送・保存時の取り扱いから始まる、一連のプリオニクス検査等生化学的および免疫組織学的BSE診断法の実施条件を緊急に標準化するとともに、と畜場での迅速検査法を開発。

本課題終了後の目標

確定診断に必要な留意事項等のマニュアル作成及びと畜場での迅速検査法の開発

- BSE脳材料の分析前処理条件の最適化
- 生化学的診断法に対する今回BSE患畜由来プリオンの反応特性解明
- 免疫組織学的診断法に適した抗体の選択
- 4時間以内の迅速検査

2 内容

脳材料の取り扱い法の最適化、分析用酵素、抗体の評価・選定による判定精度の一層の向上及びエライザ法の改良によると畜場でのスクリーニング検査の迅速化

3 新規性

9月10日我が国初発のBSE患畜確認に対する緊急対応である。

諸外国の現状等

1 現状

世界的に発病後の死亡材料についての確定診断法として、病理組織学的および免疫組織学的方法による診断と、異常プリオン蛋白質の検出を目的とするウェスタンプロット法やエライザ法など生化学的診断法が開発されているが、その判定に要する時間や精度と感度には一長一短があり、我が国で発生したBSEでの適用条件について検討する必要がある。

2 我が国の水準

動物のプリオン病に関する我が国の研究は、国内発生のあるヒツジのスケレイパーを対象として進められてきた。これらの研究において、ヒツジの異常プリオン蛋白質に対する各種特異抗体の作出、微量の異常プリオン蛋白質検出法であるイムノPCR法の開発をはじめ、それら開発手法を用いて異常プリオン蛋白質の体内分布を調べ扁桃の生検材料による生前診断法を開発している。

研究進展・成果がもたらす利点

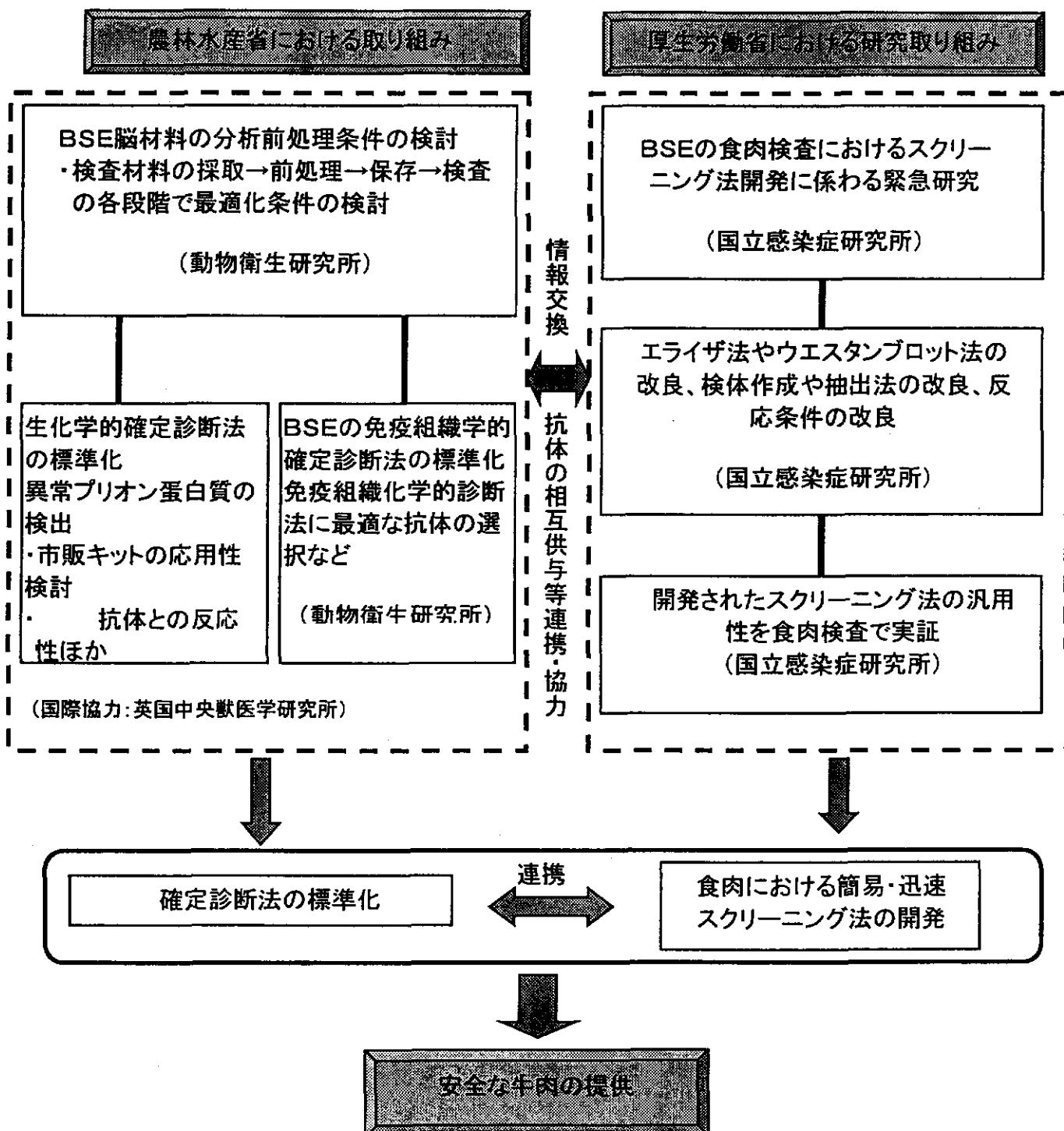
1 世界との水準の関係

我が国初発のBSE患畜であり、英国を中心とする既往例と緊急に比較検討する必要がある。

2 波及効果

我が国における分析試料の採取・スクリーニング・輸送・保存時の取り扱いから始まる、一連のプリオニクス検査等の生化学的診断及び免疫病理学的診断法の実施条件を標準化するとともにと畜場における迅速検査が実用化されることにより、今後予定される本格的な検査開始において異常プリオンの検出がより一層包括的かつ確実なものとなり、食肉の安全性を確保できる。

「牛海綿状脳症（BSE）診断法の標準化に関する緊急調査研究」の研究体制



所用経費

我が国における牛海綿状脳症(BSE)診断法の標準化に関する緊急調査研究			(単位:千円)
研究項目	担当機関等	研究担当者	所用経費
1. 我が国における牛海綿状脳症(BSE) 診断法の標準化に関する緊急調査研究			
(1) 牛海綿状脳症(BSE)脳材料の分析前 処理条件の検討			
①牛の延髄における神経核の分布に関する研究	(独)農業技術研究機構動物衛生研究所	播谷 亮	4,480
②脳の固定前の保存の病理組織学的検査に及ぼす影響	(独)農業技術研究機構動物衛生研究所	播谷 亮	4,480
③牛海綿状脳症(BSE)感染牛の延髄の各領域 におけるPrPScの蓄積量の検討	(独)農業技術研究機構動物衛生研究所	横山 隆	4,127
(2) 牛海綿状脳症(BSE)の生化学的確定診断法 の標準化			
①牛海綿状脳症(BSE)各種生化学的診断法の 比較とその標準化	(独)農業技術研究機構動物衛生研究所	横山 隆	11,216
②牛海綿状脳症(BSE)生化学的診断法の改良	帯広畜産大学畜産獣医学部	品川森一	5,533
(3) 牛海綿状脳症(BSE)の免疫病理学的確定診 断法の標準化			
①牛海綿状脳症(BSE)の免疫病理学的確定診 断法の標準化	(独)農業技術研究機構動物衛生研究所	久保正法	6,622
(4) 牛海綿状脳症(BSE)の畜場におけるスクリ ーニング法開発に係る緊急研究			
①異常型プリオントンパク質の濃縮法の検討	国立感染症研究所	山河芳夫	15,420
②迅速で正確なBSEの免疫染色法の開発	国立感染症研究所	佐多徵太郎	20,000
(5) 研究進捗管理	(独)農業技術研究機構動物衛生研究所	清水実嗣	972
合 計			72,850

研究成果の概要

本研究は、BSEの国内初発生のあった平成13年9月以降に開始されたものであるが、その成果はBSE検査法の標準化に大きく貢献している。各研究サブテーマの成果は概略以下のとおりである。

1. 1. 牛海綿状脳症(BSE)脳材料の分析前処理条件の検討(播谷亮)

BSEの診断は、脳材料を用いた病理組織学的、免疫組織化学的および生化学的検査により行われるが、それらの前提となる脳材料の的確な採材部位や固定条件に関する検討はこれまで充分には実施されてこなかった。本研究では、BSEの診断に適した採材部位を明らかにし、また脳の固定条件の病理診断への影響を評価することを目的とし、以下の成果を得た。1) BSEの病理組織学的診断に適した採材部位を明らかにするために、健康牛の延髄門領域における神経核の分布を検査したところ、BSEの病理組織学的診断で重要な三叉神経脊髄路核、孤束核および迷走神経背側核全てを確實に観察するためには、門から頭側約8.5mmまでの部分を採材する必要があることが示された。2) 脳の固定前の保存の病理組織学的検査に及ぼす影響について検査したところ、96時間冷蔵保存した組織では、一部の灰白質で海綿状変性と類似した小空胞形成が散見された。3) BSE感染牛の延髄の各領域におけるPrP^{Sc}の蓄積量について検討したところ、延髄前部(橋側)の方が、後部(脊髄側)より多量のPrP^{Sc}が蓄積することが明らかとなった。以上の成果は、BSEのスクリーニング検査と確定検査のための脳材料の採材方法とその後の処理における指針となるものである。なお、今回検討したBSE材料の個体数に制約があることから、今後も国内外の関係研究機関等との連携により検討を重ねる必要がある。

1. 2. 牛海綿状脳症(BSE)の生化学的確定診断法の標準化(横山隆)

BSEの生化学的確定診断法についてスクリーニング検査、確定検査の両面からの検討を行った。市販のBSE診断キットの有用性、操作性について検討し、各キットについて良好な成績を得た。さらに、BSE試料の保存条件や調製後の試料の保存に伴う検出結果への影響を検討した。BSE確定診断に用いるWBを簡便・迅速かつ検出感度の高い方法に改良し標準化した。認識するエピトープが異なる3種類の抗体(モノクローナル抗体44B1, T2、ポリクローナル抗体B103)を確定診断用の抗体として選択、さらに確定診断のための生化学的検査プロトコールを策定し、検査体制を整備した。スクリーニング検査のELISAに比べて、検出感度が高いWBを確定検査として整備することができた。これらの成果は、農林水産省並びに厚生労働省において実施しているBSEサーベイランス検査に活用されている。

1. 3. 牛海綿状脳症(BSE)の免疫病理学的確定診断法の標準化(久保正法)

農林水産省BSEサーベイランス事業では、BSEの確定検査のひとつである免疫組織化学的検査は当面動物衛生研究所が担当することになっている。しかしながら、将来的には当該検査を動物衛生研究所以外の機関が担当することが予想され、その際には免疫組織化学的検査に用いる一次抗体には、ロット差や量的制約のあるポリクローナル抗体に代えて、性状が均一で大量供給が可能なモノクローナル抗体を用いることが望ましい。そこで本研究ではモノクローナル抗体の作出を試み、免疫組織化学的検査における反応性を検討した。また、平成13年9月のBSE国内初発例は、当時実施されていた農林水産省BSEサーベイランス事業のなかで、県が実施した病理組織学的検査において確認検査の必要のある症例として摘発された。このように、病理組織検査は依然BSEの診断において重要な位置づけになっているが、国内飼養牛に延髄における海綿状病変を示すものの、確定検査の結果でBSE陰性となつた症例が認められている。そこで本研究では、農林水産省BSEサーベイランス事業並びにBSEとの類症鑑別を目的に全国から搬入された国内飼養牛の延髄について、病理組織学的検討を行つた。その結果、平成13年9月に千葉県で摘発された症例以外にBSEと診断される症例はなかつたが、BSEを疑う神経症状を呈する症例には、非化膿性脳炎、悪性カタル熱、牛伝染

性鼻気管炎、ヘモフィルス・ソムナス感染症など多種類の疾病が存在することが判明した。さらに、組換えマウス PrP に対するマウスモノクローナル抗体の作製を試み、従来のウサギのポリクローナル抗体と同等の高い特異性を示すモノクローナル抗体を開発し、免疫組織化学的診断への有用性を確認した。

1. 4. 牛海綿状脳症（BSE）のと畜場におけるスクリーニング法開発に係る緊急研究（佐多徹太郎）

BSE のと畜場におけるスクリーニング法開発に係る緊急研究として、平成 13 年 11 月から研究を開始した。平成 13 年 10 月から全国で始まった牛海綿状脳症検査では、スクリーニング検査として ELISA が、確認検査として WB および病理・免疫組織化学検査が用いられている。これらの検査法は試料中の PrP^c をあらかじめ蛋白分解酵素等で消化分解した後に、これらに抵抗性で残存する PrP^{Sc} を酵素抗体法で検出することを基本原理としている。スクリーニング検査で採用されているバイオラッドの検査キットでは、本来陰性である検体が陽性と判定されるいわゆる疑陽性例が、今まで 0.01% 程度の頻度で認められている。その原因として、①抗体の非特異反応、②プロテイナーゼ K による PrP^c の消化が不十分であることなどが考えられる。検査の信頼性や正確性を期するためには原因となる物質を予め除去しておくことが望ましい。PrP^{Sc} の簡便な特異的濃縮方法について検討した。その結果、リンタングステン酸を用いた沈澱法により PrP^{Sc} を簡便に濃縮することが判明した。スクリーニングにおける牛延髄組織をこの方法で前処理することにより、正確で信頼性のある結果をもたらすことができよう。また、病理免疫組織化学的検査の迅速化を図ることを目的として、種々の検討を行った。BSE プリオンは BSL-2 病原体でありホルマリン固定後でも感染性は維持され、ギ酸処理でも完全に不活化されないので、バイオセーフティ処置が必要である。病理組織形態の保持とともにプリオンを延髄組織内で高い感度で検出するための条件を検討し、我が国の BSE 陽性及び陰性牛延髄検体で確認した。その結果、2 日以内で結果ができるプロトコールを確立した。

研究成果公表等の状況

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	1 件	5 件	14 件	20 件
国外	3 件 (1)	0 件	0 件	3 件 (1)
合計	4 件 (1)	5 件	14 件	23 件 (1)

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと)

【特許出願等】 0 件 (国内 件、国外 件)

【受賞等】 0 件 (国内 件、国外 件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	サブテーマ 3	サブテーマ 4	合計
J. Biol. Chem.	7.258		1			7.258
J. Dermatol. Sci.	1.053		1			1.053
J. Vet. Diagn. Invest.	1.265		1			1.265
J. Vet. Med. Sci.	0.533		1			0.533
主要雑誌小計	10.109		4			10.109
発表論文合計	10.109		4			10.109