平成２４年度　成績概要書

研究課題コード：　6102－624502　（公募型研究）

１．研究成果

１）研究成果名：試験管内増幅法を用いた BSE 発症牛の唾液からのプリオン高感度検出技術
（予算課題名：BSE 実験感染牛を用いた発症前診断技術の検証）
２）キーワード：牛、唾液、BSE、プリオン高感度検出技術、類症鑑別
３）成果の要約：試験管内増幅法の感度は検体のリンタングステン酸 Na による濃縮で高まり、唾液中に異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）が極微量存在すれば検出できる。また特異性は高く、類似疾病の鑑別法として有用であることが示唆された。BSE 発症前の唾液に PrP^{Sc} は含まれず、唾液による発症前診断は困難であると考えられた。

２．研究機関名

１）担当機関・部・グループ・担当者名：畜産試験場・基盤研究部・畜産工学Ｇ　福田茂夫、家畜衛生Ｇ
２）共同研究機関（協力機関）：（動物衛生研究所プリオン病研究センター）

３．研究期間：平成 20～24 年度　（2008～2012 年度）

４．研究概要

１）研究の背景

牛海綿状脳症（BSE）は食肉を介する人獣共通感染症として、消費者の関心は依然として高く、畜産物の生産や流通における監視・管理が強く求められている。しかしながら、BSE の診断は脳を用いて行われ、生前診断は困難である。Murayama ら（2010 年）により、BSE のプリオン試験管内増幅（Protein Misfolding Cyclic Amplification: PMCA）法が開発され、BSE 感染牛の唾液から異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の検出が可能となった。この技術を BSE 診断へ応用するには、BSE 感染牛や他の疾病牛などから採取した材料による特異性の検証が必要である。

２）研究の目的

PMCA 法を用いた BSE プリオン高感度検出技術について、BSE 実験感染牛および他の疾病牛の生体からの材料を用い、感度と特異性を確認し、BSE 発症前診断の可能性を検証する。また BSE と類症疾患の鑑別法としての PMCA 法の有用性を検討する。

５．研究方法

１）PMCA 法を用いた唾液試料中の PrP^{Sc} 検出感度の検証

・ねらい：正常牛の唾液に BSE 実験感染牛の脳乳剤を添加した試料を用いて、PMCA 法を用いた PrP^{Sc} 検出感度を検討する。

・試験項目等：10 倍階段希釈した BSE 感染脳乳剤を添加した唾液を検体とした。リンタングステン酸ナトリウム（Na-PTA）溶液を用いて検体を濃縮し、Murayama らの方法に準じ PMCA（図１）法による PrP^{Sc} の増幅を行った。PMCA 増幅産物を、蛋白分解酵素で消化し、ウエスタンブロット（WB）法により PrP^{Sc} を検出した。

２）PMCA 法を用いた BSE 実験感染牛の唾液からの PrP^{Sc} の検出

・ねらい：PMCA 法を用いた BSE 実験感染牛の唾液からの PrP^{Sc} 検出を試みる。

・試験項目等：発症前または発症後の BSE 実験感染牛 2 頭の唾液を供試した。１）と同様に Na-PTA 濃縮および PMCA 法による増幅を行い、WB 法にて PrP^{Sc} を検出した。

３）PMCA 法を用いた唾液からの PrP^{Sc} 検出による起立不能等の類症鑑別

・ねらい：起立不能等の類似疾病牛の唾液を用い、PMCA 法を用いて PrP^{Sc} 検出を行い、PMCA 法による増幅の特異性を検証し、BSE と起立不能等の疾病との類症鑑別の可能性を検討する。

・試験項目等：北海道十勝管内 A 町において、起立不能等により廃用となった疾病牛 37 頭の唾液について、１）と同様に Na-PTA 濃縮および PMCA 法による増幅を行い、WB 法にて PrP^{Sc} を検出した。

６．研究の成果

１）唾液試料中の PrP^{Sc} 検出について、Na-PTA 濃縮と PMCA 法の組合せにより、ラウンド 4（図１の PMCA 反応サイクルを 4 回反復）にて 10^{-11} 倍濃度までの検出が可能であった。この方法により、未濃縮・未増幅時に比較して感度は 10 億倍（10^{-2}→10^{-11}）高くなった（図２）。PrP^{Sc} が極微量存在すれば、検出可能と考えられた。

２）Na-PTA 濃縮および PMCA 法により、発症後に採取した BSE 実験感染牛の唾液から、ラウンド 4 で PrP^{Sc} が検出された（図３）。また、この唾液に含まれる PrP^{Sc} は、BSE 感染脳乳剤の 10^{-11} 倍濃度検体とほぼ同等の極少量であると推察された。発症前の唾液からは PrP^{Sc} は検出されなかった。これまでの報告からも、発症前（発症直前を除く）の唾液には PrP^{Sc} が含まれないため、唾液からの PrP^{Sc} の検出による BSE 発症牛の生前診断は可能であるが、発症前診断は困難であると考えられた。

３）起立不能等疾病牛から採取した唾液では、全例が陰性であり（表１）、PMCA 法による唾液中 PrP^{Sc} 検出の高い特異性が示され、BSE と類似疾病の鑑別法としても有用であることが示唆された。

＜具体的データ＞

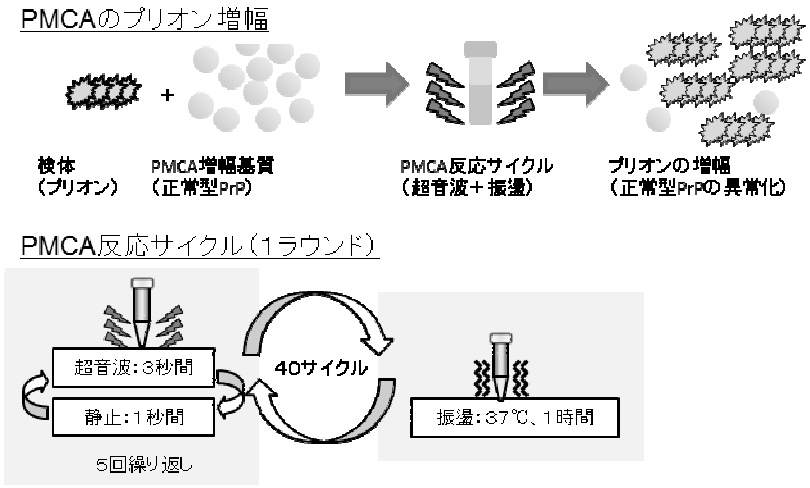

図１　PMCA 法によるプリオン増幅と PMCA 反応サイクル

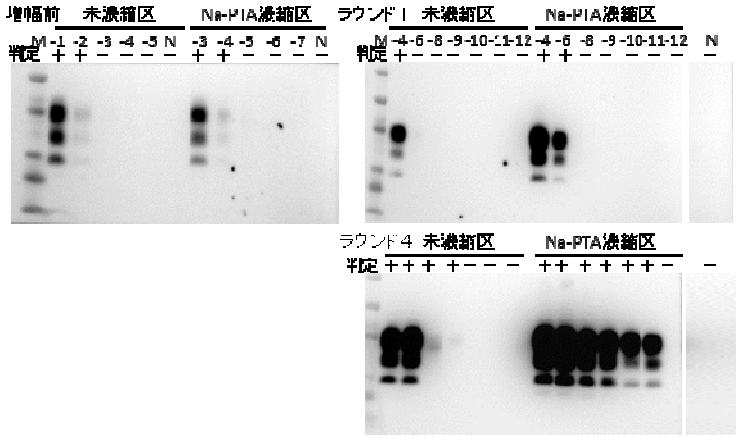

図2　PMCA 法により増幅した BSE 脳乳剤添加唾液の PrP^{Sc} 検出
M：サイズマーカー　　N：陰性対照
数字は検体の希釈倍率の乗数（10^n）を示す。

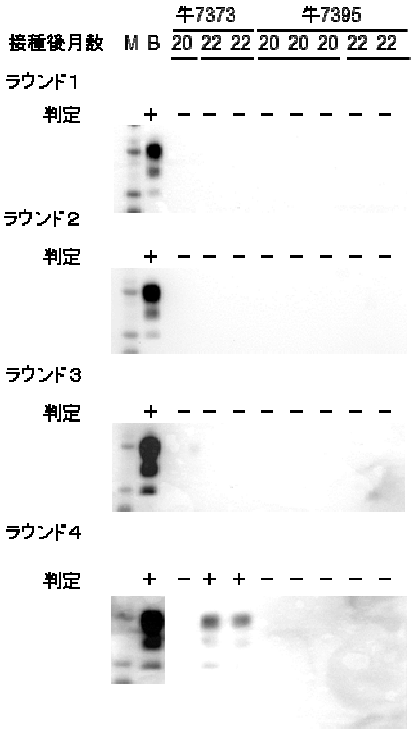

図３　PMCA 法を用いた BSE 実験感染牛の唾液からの PrP^{Sc} の検出
M：サイズマーカー
B：BSE 陽性対照
牛 7373 は、接種後 21 ヶ月から 22 ヶ月解剖まで音への過剰反応等 BSE の臨床症状が確認された。牛 7395 は、接種後 22 ヶ月の解剖まで明瞭な臨床症状は観察されなかった。解剖後の脳からは 2 頭とも PrP^{Sc} が検出された。

表１　PMCA 法の特異性検証に用いた類似疾病牛の内訳と唾液からの PrP^{Sc} 検出

診断名	症例数	死亡牛 BSE 検査 陽性数	唾液 PMCA 陽性数
内転筋断裂	12	0	0
関節炎	4	0	0
乳房炎	4	0	0
神経麻痺※1	4	0	0
ダウナー症候群、乳熱	4	0	0
股関節脱臼	3	0	0
その他※2	6	0	0
計	37	0	0

※１：坐骨神経麻痺２例、橈骨神経麻痺１例、腓骨神経麻痺１例
※２：心室中隔欠損、ケトーシス、第四胃変位、蹄底潰瘍、筋炎、後大静脈血栓症　各１例

７．成果の活用策

１）成果の活用面と留意点

（１）本試験の成果は、BSE 発症前診断技術開発のための基礎知見として研究開発に活用される。
（２）本試験の結果は、脳内接種による BSE 実験感染牛の材料によるものである。
（３）本試験は、農林水産技術会議事務局委託プロジェクト研究「鳥インフルエンザ、BSE、口蹄疫等の効率的なリスク低減技術の開発」により実施した。

２）残された問題とその対応