

## 成績概要書 (2005 年 1 月作成)

研究課題：BSE 疑似患畜の経過観察と脳内接種法の確立

(疑似患畜を用いた発症前のプリオン動態)

担当部署：道立畜試 畜産工学部 遺伝子工学科、感染予防科、代謝生理科

協力分担：

予算区分：外部資金

研究期間：2002～2004 年度 (平成 14～16 年度)

### 1. 目的

2004 年 12 月現在、国内において 14 頭の牛海綿状脳症 (BSE) 患畜が確認されているが、生前に発症を確認された例はない。BSE の病態解析や診断法の開発など BSE 研究を推進する上で、生きた BSE 感染牛を確保することは急務である。本課題では、BSE の生前診断の可能性を検討するため、BSE の発症を想定して、BSE 発生農場から疑似患畜を導入し、疑似患畜の臨床症状の観察や生体材料からのプリオンあるいはその他指標になると考えられる生化学的項目を解析した。さらに、BSE 実験感染牛作出のための脳内接種法による牛への感染実験方法を検討した。

### 2. 方法

#### 1) BSE 疑似患畜の経過観察

#### 2) BSE 感染実験のための脳内接種法の確立

(1) 子牛の頭部標本を用いた接種部位の検討

(2) 脳内接種の影響と脳乳剤の脳内分布

(3) 子牛への BSE 感染脳乳剤脳内接種法プロトコルの作成

### 3. 成果の概要

#### 1) BSE 疑似患畜の経過観察

道内の BSE 発生農場 2 戸から疑似患畜 18 頭を導入した。導入した疑似患畜は、いずれの牛においても BSE 発症を疑う異常な臨床症状は示さなかった。また、死亡あるいは鑑定殺を行った 16 頭は、ELISA 法による延髄の BSE 検査で陰性であった。ウエスタンブロット法による尿の解析では、すべての検体でプリオンは検出されなかった。血液および血清生化学分析は概ね正常な値で推移した (表 1)。二次元電気泳動による血漿蛋白質の解析は観察途中から出現するスポットが存在した。また、脳脊髄液の生化学検査および脳脊髄液 S-100B 蛋白質濃度においては一時的な変化を示す個体があったが、概ね安定して推移し、中枢神経障害を疑う所見は無かった (図 1)。

#### 2) BSE 感染実験のための脳内接種法の確立

(1) 子牛の頭部標本を用い、接種方法を検討した。前頭骨はピンドリルにより容易に貫通することができ、また角間隆起から 1 cm 鼻側、正中線から 2 cm 右側の点はカテラン針を用いての脳幹部への穿刺が可能であった。

(2) 検討した穿刺点から、子牛へ脳乳剤を接種した。脳乳剤接種後 3～4 時間の観察においては、異常な臨床所見は無かった。病理解剖および CT スキャンによる頭蓋腔内の観察においては、接種した脳乳剤のほとんどは脳実質に留まらず、脳脊髄中に分散し、各脳室および中脳水道に分布することが明らかとなった (図 2)。本法による子牛への脳内接種は BSE 感染脳乳剤を BSE 病変好発部位へ到達しやすくし、高い感染性が期待された。

(3) これらの知見を体系化し、子牛への BSE 感染脳乳剤脳内接種法プロトコルを作成した (表 2)。

以上のように、本試験で導入した疑似患畜は、BSE を発症せず、脳組織におけるプリオンの蓄積も無かった。また、牛への BSE 感染試験を行うための脳内接種方法を確立し、プロトコルを作成した。なお、本年より開始した動物衛生研究所との共同研究で、この脳内接種法プロトコルを用いた BSE 感染試験を子牛 21 頭に行い (図 3) 経過を観察中である。

表 1 . 疑似患畜の経過観察

検査項目	検査結果
臨床症状	一般臨床症状、神経学的臨床症状*
血液	血液および血清生化学検査
尿	ウエスタンブロット法によるプリオンの検出
脳脊髄液	S-100B 蛋白質、総蛋白質量
死亡または鑑定殺	病理解剖と延髄門部の BSE 検査

\* 神経学的臨床症状検査の項目

- 神経症状 : 不安、興奮、歯ざしり、耳介の動き等における異常の有無。
- 姿勢や運動の異常 : 頭を下げる、頭部を壁・柵にこすりつける、震え等の異常行動の有無。
- 知覚の異常 : 音への過剰反応、光への過剰反応、接触への過剰反応等の有無。
- 性格の変化 : 食欲、いななき・うなり、攻撃性。

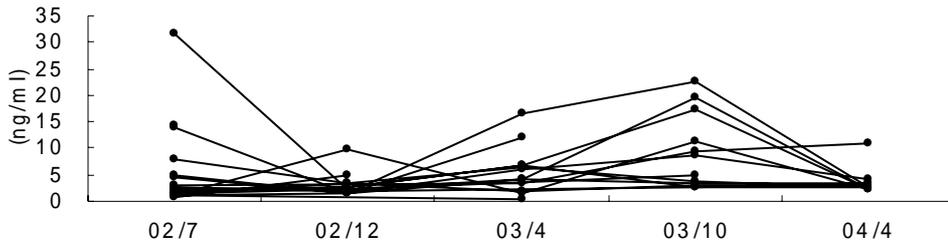


図 1 . 脳脊髄液中 S-100B 濃度の変化

表 2 脳乳剤脳内接種法のプロトコル

- (1) 被験牛を、感染実験施設（動物バイオセーフティ基準 2 : ABSL2）に搬入。
- (2) キシラジン（0.25mg/kg）により鎮静。
- (3) 頭部保定装置で手術台に頭部を保定。
- (4) 述部を消毒。
- (5) 角間隆起から 1 cm 鼻側、正中線から 2 cm 右側の点（穿刺点）に印をつける。
- (6) 塩酸リドカインによる局所麻酔後、穿刺部を 3 cm 程度切開。
- (7) ピンドリルを前後に垂直、やや先を正中に向け、前頭骨を貫通。
- (8) 脳幹部に向け、ゆっくり脳乳剤入り 18G カテラン針付き 1 ml シリンジを挿入。
- (9) ゆっくり接種材料を半分注入し、さらに針を抜きながら残りを注入。
- (10) 針を抜く。助手は脳脊髄液を吸引除去。
- (11) ネジで、前頭骨貫通孔を塞ぐ。
- (12) 縫合。抗生物質の全身投与。
- (13) 飼育施設（ABSL 1）に搬入。

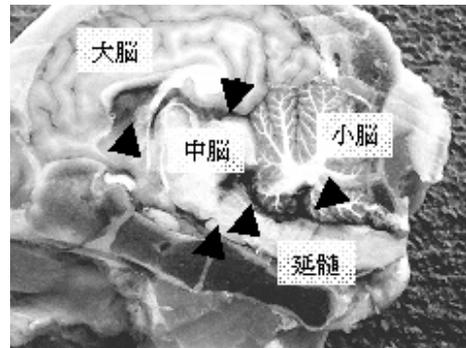


図 2 着色脳乳剤の分布(矢印:染色部位)

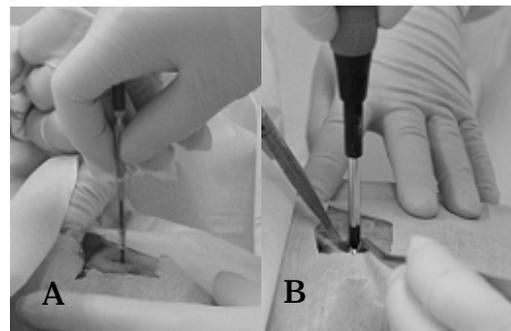


図 3 ピンドリルによる前頭骨貫通(A)、吸引除去およびネジ装着(B)

#### 4 . 成果の活用面と留意点

牛への脳内接種による BSE 感染実験は、動物バイオセーフティ基準(ABSL)2を必要とする。また、BSE 感染脳乳剤の調整にはバイオセーフティ基準 3 実験室、感染実験に用いた動物の飼養には ABSL 1 施設を必要とする。

#### 5 . 残された問題点とその対応

BSE の感染および発症機序、感染因子の特性など未だ不明な点が多いことから、本疾病の病態解析や診断法の開発を行う。