

## [成果情報名]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

[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<sup>Sc</sup>) 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る。

[キーワード]牛、唾液、BSE、プリオン高感度検出技術、類症鑑別

[代表連絡先]電話 0156-64-5321

[研究所]道総研畜産試験場・基盤研究部・畜産工学グループ

---

### [背景・ねらい]

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<sup>Sc</sup>) 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。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。

### [成果の内容・特徴]

1. 正常牛の唾液中に BSE 実験感染牛の脳乳剤を添加した試料中の PrP<sup>Sc</sup> 検出について、リンタングステン酸 Na (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る。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 ( $10^{-2} \rightarrow 10^{-11}$ ) 高くなる (図 2)。PrP<sup>Sc</sup> が極微量存在すれば、検出可能と考えられる。
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<sup>Sc</sup> が検出される (図 3)。また、この唾液中に含まれる PrP<sup>Sc</sup> 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る。発症前の唾液からは PrP<sup>Sc</sup> は検出されない。これまでの報告からも、発症前 (発症直前を除く) の唾液中には PrP<sup>Sc</sup> が含まれないため、唾液からの PrP<sup>Sc</sup> 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る。
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<sup>Sc</sup> 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る。

### [普及のための参考情報]

1. 普及対象：国内研究機関
2. その他：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。

[具体的データ]

PMCAのプリオン増幅



PMCA反応サイクル(1ラウンド)

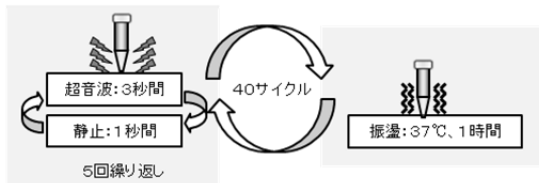


図1 PMCA法によるプリオン増幅とPMCA反応サイクル

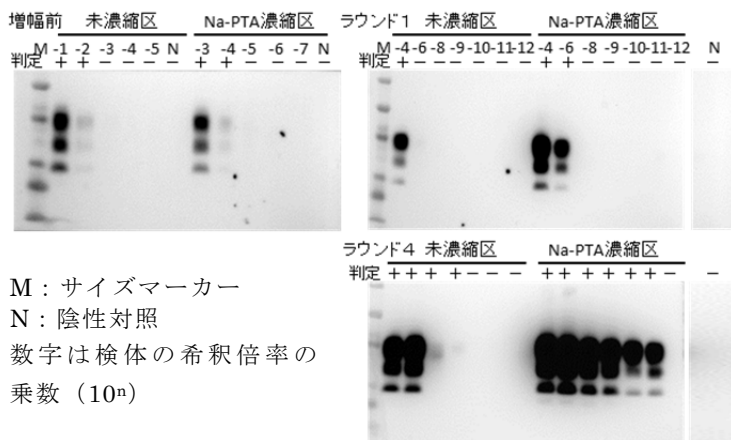


図2 PMCA法により増幅したBSE脳乳剤添加唾液のPrP<sup>Sc</sup>検出

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<sup>Sc</sup>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
乳房炎・関節炎	8	0	0
神経麻痺 <sup>※1</sup>	4	0	0
ダウンナー症候群、乳熱	4	0	0
股関節脱臼	3	0	0
その他 <sup>※2</sup>	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

(福田茂夫)

[その他]

予算区分: 委託プロ (鳥インフルエンザ、BSE、口蹄疫等)

研究期間: 2008~2012年度

研究担当者: 福田茂夫、藤井貴志、陰山聡一、藤井 啓、平井綱雄、南橋 昭、仙名和浩  
 発表論文等: Fukuda S. et al.(2012) Jpn J Infect Dis. Jan;65(1):37-44.

平成24年度北海道農業試験会議(成績会議)における課題名および区分

「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」(研究参考)

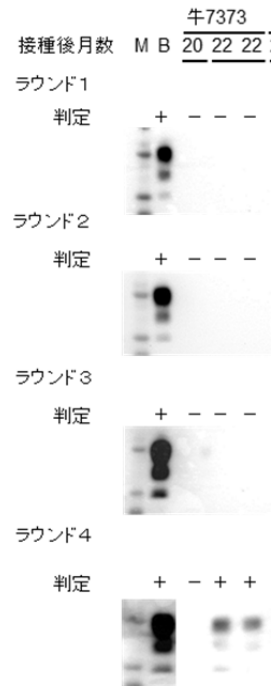


図3 PMCA法を用いたBSE実験感染牛の唾液からのPrP<sup>Sc</sup>の検出

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が確認された。