

牛海綿状脳症に関わる飼料等の安全性評価法および
肉骨粉の不活化・有効利用技術の開発

1 中核機関・研究総括者

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所 品川 森一

2 研究期間

2002～2004年度（3年間）

3 研究目的

わが国における牛海綿状脳症（BSE）の発生により、飼料や肥料の安全性の確保のため牛肉骨粉使用が停止していることから、牛肉骨粉を含む飼料および肥料の処理が課題となっている。そのため、異常プリオン蛋白質や動物性蛋白質検出法など飼料および肥料の安全性評価技術の開発を行うとともに、異常プリオン蛋白質の不活化技術や牛肉骨粉など家畜残渣の新たな有効利用技術を開発することを目的とする。

4 研究内容及び実施体制

- ① 飼料および肥料中の動物性蛋白質の鋭敏で迅速な検出法の開発（独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所、京都大学大学院・農学研究科、（財）日本生物科学研究所）

近赤外分析法、PCR法、DNAチップ法および動物組織蛋白特異抗体を用いて飼料や肥料中の動物性蛋白質の鋭敏で迅速な検出法を開発する。

- ② 異常プリオン蛋白質の検出による飼料および肥料の安全性確認技術の開発（独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所、（財）日本生物科学研究所、広島大学大学院・生物圏科学研究科）

異常プリオン蛋白質の増幅法、高特異性モノクローナル抗体および超高感度検出法を用いて本蛋白質の微量検出技術を開発する。

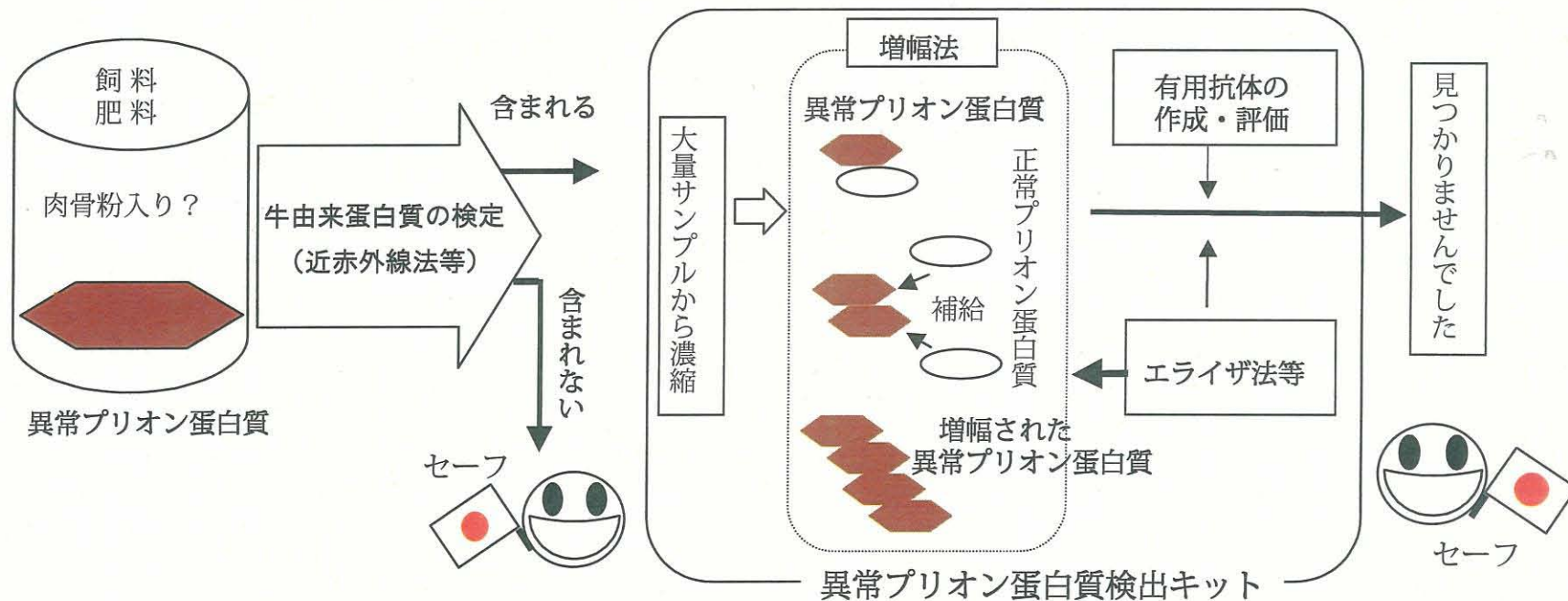
- ③ 異常プリオン蛋白質の不活化および肉骨粉・飼料・肥料等の有効利用技術の開発（東京薬科大学・生命科学部、（株）御池鐵工所、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・九州沖縄農業研究センター）

異常プリオン蛋白質分解微生物およびその酵素を用いた不活化技術ならびに、燃焼エネルギーと灰化物の利用による肉骨粉等の低コスト処理装置を開発する。

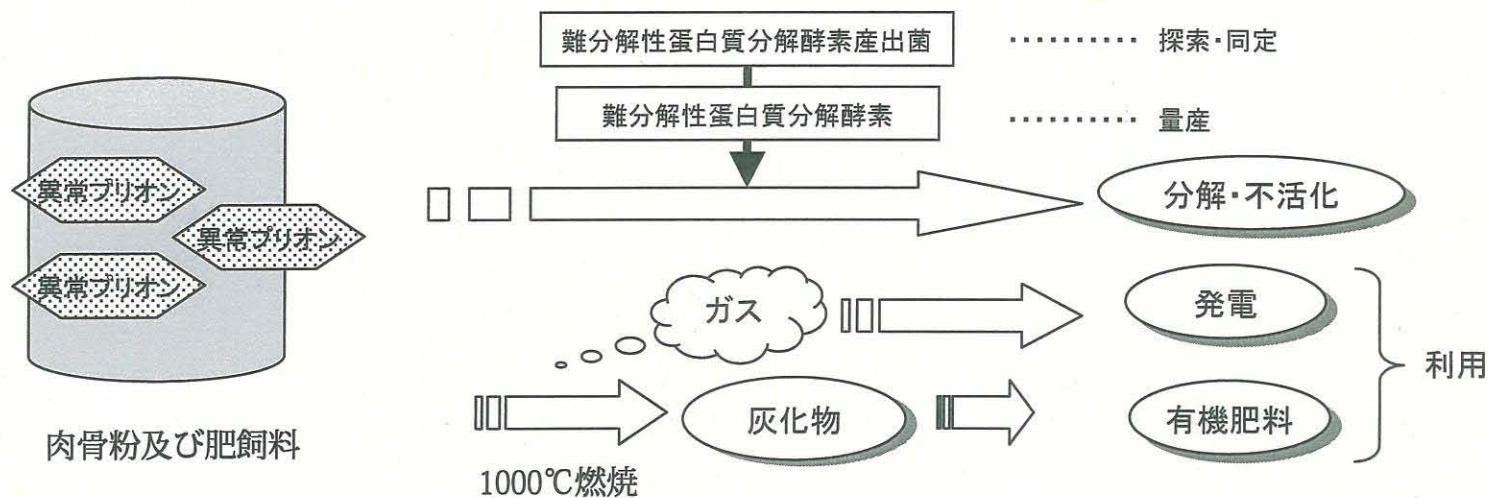
5 目標とする成果

飼料および肥料からの異常プリオン蛋白質や牛由来成分の検出技術を開発することにより、BSE のリスクを排除した安全な飼料および肥料の利用と供給に資する。また、低コストで持続的な牛肉骨粉処理技術や異常プリオン蛋白質の微生物的不活化技術の開発により、肉骨粉や牛副産物などの処理および有効利用技術を確立することによって、牛肉生産における対BSE安全性が保証されたリサイクルシステムの構築を図る。

肥飼料中の牛由来蛋白質と異常プリオン蛋白質の検出法の開発



異常プリオン蛋白質の不活化及び肉骨粉の有効利用技術の開発



■研究課題名

【牛海綿状脳症に関わる飼料等の安全性評価法および肉骨粉の不活化・有効利用技術の開発】 (2002～2004年度)

〔中核機関・研究総括者名〕 (独) 農業・生物特定産業技術研究機構動物衛生研究所 品川森一

〔共同機関名〕 広島大学、京都大学、東京薬科大学、(財)日本生物科学研究所、(株)御池鐵工所

●研究の背景・目的

わが国では牛海綿状脳症(BSE)の発生により、飼料や肥料への牛肉骨粉の使用が停止されており、牛肉骨粉を含む飼料および肥料の処理が課題となっています。そのため、動物性蛋白質や異常プリオン蛋白質の検出法など、飼料および肥料の安全性評価技術の開発を行うとともに、牛肉骨粉など家畜残さの新たな有効利用技術を開発します。

●成果の内容・特徴

- (1) 飼料や肥料中に含まれる牛肉骨粉を判別する技術を開発しました。
 - ① 散在性反復配列を標的にしたプライマーによるPCR法を用いると0.01%もしくはそれ以下の割合で飼料中に含まれる肉骨粉を検出できます(図1)。
 - ② 近赤外分析法では肥料中に含まれる0.5%の肉骨粉を識別できます(図2)。
 - ③ 牛由来抗原に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチエライザ法を用いると、牛と豚、鶏由来の抗原を識別できます(図3)。
 - ④ クロロホルムで比重により骨片を分別し、DNA抽出の際に次亜塩素酸ナトリウム処理を行うことで、牛骨由来のDNAのみを検出することが可能になりました(図4)。これにより代用乳の影響を排除して、肉骨粉を含む飼料を識別できます。
- (2) 牛肉骨粉を高温燃焼することにより発電エネルギーとして利用する技術、灰化物について肥料として利用するための有効成分の回収処理技術の開発を行っています(図5)。

●今後の展開と波及効果

- (1) 飼料や肥料中の動物性蛋白質あるいは異常プリオン蛋白質の鋭敏で迅速な検出法のキット化を図ります。
- (2) 1000℃で燃焼させた肉骨粉灰化物は窒素成分を含んでおらず、リン酸に富んでいることから、リン酸補給肥料として利用できます。不良在庫になっている肉骨粉や飼料および肥料の有効利用技術を確立することによって、牛肉生産における安全なリサイクルシステムの構築が期待されます。

●知的財産権取得状況

特許出願1件

●主なデータ・図表

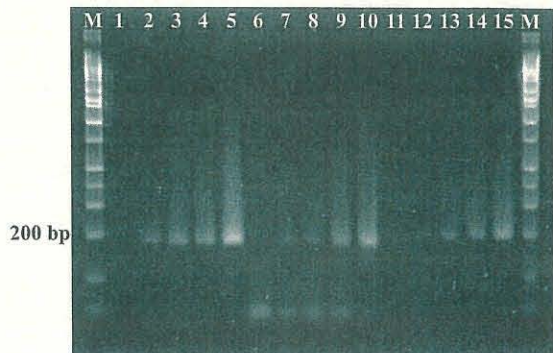


図1 飼料中に混入した動物由来DNAの検出結果

レーンM, DNAサイズマーカー。1~5, 肉骨粉を0, 0.001, 0.01, 0.1および1.0%の割合で飼料に混入させた場合のPCR反応産物(反芻動物用Art2プライマー使用)。6~10, 豚用PRE-1プライマー使用。11~15, 鶏用CR1プライマー使用。

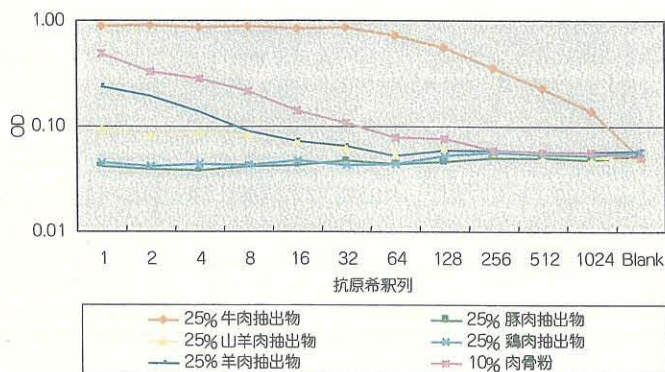


図3 牛由来抗原特異的エライザ系の確立

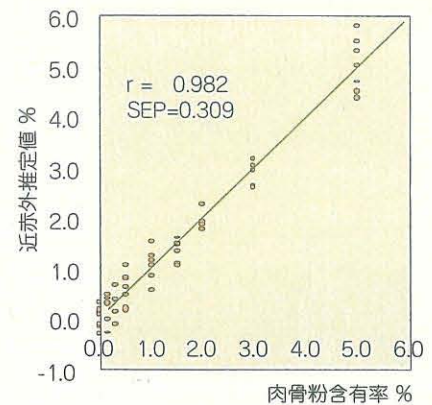


図2 肥料中の肉骨粉含有率の検出精度

MILK	-	+	+	+
NaClO ₂	-	+	-	+
MBM	-	-	-	+

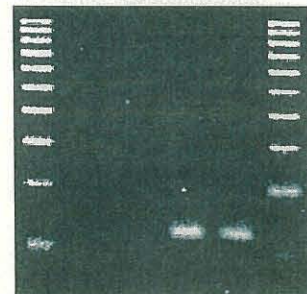


図4 次亜塩素酸ナトリウムを用いた配合飼料中に混入した代用乳と肉骨粉の識別

MILK: 代用乳, NaClO₂: 次亜塩素酸ナトリウム, MBM: 10% 肉骨粉

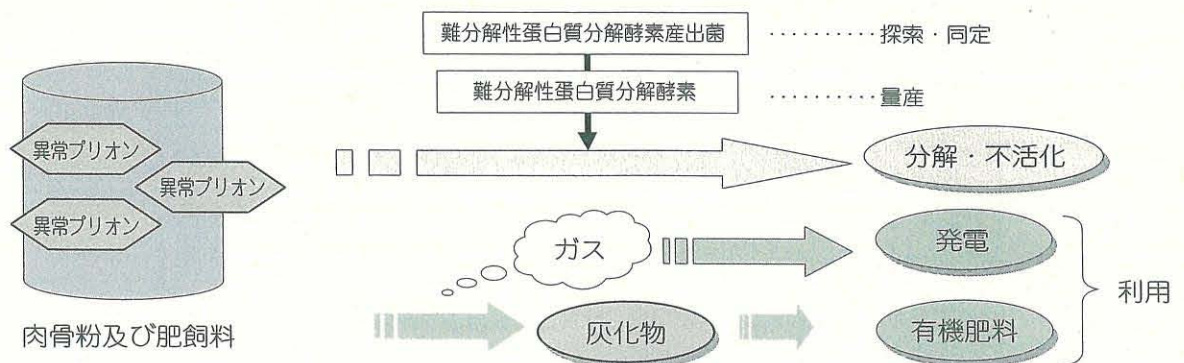


図5 異常プリオン蛋白質の不活化及び肉骨粉の有効利用技術の開発

●問い合わせ先

動物衛生研究所 プリオン病研究センター 安全性技術開発研究チーム

TEL/FAX 029-838-8333

○学会誌等

著者名	テーマ名	学会誌名	巻(号)	発行年	ページ
K.Tajima,O.Enishi,M.Amari, M.Matsumoto,H.Kjikawa,S.Y anai,H.Matusi,H.Yasue,T.Mit suhashi T.Kawashima	PCR detection of DNAs of Animal Origin in feed by promoters based on sequences of short and long interspersed repetitive elements	Biosci.Biotechnol. Biochem.	66	2002	2247- 2250
Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., and Sawada, J.	G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G	Biol. Pharm. Bull.	25(6)	2002	728- 733
Nakamura, N., Shimokawa, M., Miyamoto, K., Hojyo, S., Horiuchi, H., Furusawa, F. and Matsuda, H.	Two expression vectors for the phage-displayed chicken monoclonal antibody	J. Immunol. Methods	280	2003	157- 164
Nakamura, N., Miyamoto, K., Shimokawa, M., Nishida, N., Mohri, S., Kitamoto, T., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.	Generation of antibodies against prion protein by scrapie-infected cell immunization of PrP0/0 mice	Hybridoma and Hybridomics	22	2003	263- 266

○出版物

著書名	著者名	出版社名	発行年
近赤外分析法による化成肥 料中に含まれる肉骨粉の定 量	草地畜産研究成果情報	畜産草地研究所	2004(予 定)
自然免疫(第4章 免疫系と プリオン)	村山裕一	Innate Immunity研究 会	2004(予 定)

牛海綿状脳症（BSE）及び人獣共通感染症の制圧のための技術開発

1 趣 旨

BSEに関しては、平成14年4月の「BSE問題に関する調査検討委員会」報告及び同年7月に施行された「牛海綿状脳症対策特別措置法」において、BSE研究についても研究体制を整備・強化し、BSE発生メカニズムの解明を急ぐべきとされたところである。

我が国は、これまで羊スクレイピーを中心に研究を実施し、羊の異常プリオン蓄積部位の解明、異常プリオンを検出するための抗体の開発、異常プリオンの高精度検出法の開発等の成果を挙げてきた。

BSE研究については、こうした研究成果を活用し、牛を対象にプリオン蛋白質の性状解明、BSE診断技術の開発を行うとともに、環境中の異常プリオン蛋白質の動態解析・不活化技術の開発等を内外の研究機関等との連携のもと実施する。

また、トリインフルエンザ、ウエストナイル熱等世界的に重要な人獣共通感染症についても、診断技術や予防技術の開発等を実施し、国内発生時における国民の不安解消と畜産業への影響軽減に資する。

2 事業内容

(1) BSE等動物プリオン病の制圧のための技術開発

①プリオン蛋白質の性状解明

②プリオン病の病態解明と診断技術の開発

③環境中の異常プリオン蛋白質の動態解析及び不活化技術の開発

(2) 人獣共通感染症の制圧のための技術開発

3 研究実施主体

農業・生物系特定産業技術研究機構等

4 研究実施期間

平成15年度～平成19年度（5年間）

5 平成16年度予算額

861（861）百万円

[担当課：農林水産技術会議事務局地域研究課]

農林水産省のBSE研究の取組み

平成12年

平成13年

平成14年

平成15年

昭和63年度より

◎国内発生のある羊スクレイピーを対象としたプリオン病の病態発生に関する基礎研究

- ・異常プリオンの扁桃への蓄積解明
- ・異常プリオンを効果的に検出するための抗体の開発(特許出願中)
- ・異常プリオンの抗原抗体反応を利用した高精度検出法の開発
 - ①イムノPCR法
 - ②免疫ビーズ法
 - (①、②とも特許出願中)

羊スクレイピーの研究成果に基づくBSE研究技術の開発

平成13年
9月10日
BSE感染牛の確認

平成13年度 科学技術振興調整費
我が国におけるBSE診断法の標準化

- ・生化学的及び免疫組織学的確定診断法の標準化
- ・と畜場におけるスクリーニング法の開発

補完関係

緊急
取り組み

平成13年度より
行政対応特別研究

英国よりBSE試料を導入し、牛海綿状脳症(BSE)の国内研究実施

- ・羊スクレイピー用抗体のBSE適応性評価
- ・高感度検出法の牛への適用

平成14年度より
国内では実施できない、BSE感染ウシを使い英国と共同研究

- ・高精度検出法の実用レベルでの有効性の確認
- ・異常プリオンの診断技術の開発
- ・プリオン病の疫学的解析

共同研究機関
英国獣医学研究所
英国ロンドン大学

BSE研究の加速化

平成13年度2次補正

動物衛生高度研究施設の整備

国内外の産学官の連携のもと、牛等の動物に異常プリオン蛋白質を人為的に感染させた研究が可能なP3レベルの高度安全施設

BSE等動物プリオン病の制圧のための技術開発

プリオン蛋白質の性状解明

プリオン蛋白質の構造及び機能解析

プリオン蛋白質の異常化機構の解明

プリオン病の病態解明と診断技術の開発

BSE診断法の
高感度・迅速化

実験感染牛を用いた
病態解析

生前診断用マーカーの開発

環境中の異常プリオン蛋白質の動態解析及び不活化技術の開発

異常プリオン蛋白質
不活化技術の開発

自然界等における異常
プリオンの動態解析

BSE発生メカニズムの解明、生前診断法の確立等

BSE研究の最近の主な成果（動物衛生研究所）

【平成13年度】

○ プリオン病の病態解析と診断法の開発

プリオン病の迅速診断法を確立するため、羊スクレイピー伝達マウスの全身臓器における異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の蓄積時期について検索した。羊スクレイピーのマウス伝達では、初代よりリンパ系組織に PrP^{Sc} が蓄積することが明らかになった。また、診断法の開発を目的に、数種類の組換えプリオン蛋白抗原をプリオン蛋白欠損マウスに免疫して単クローン抗体 (MAb) を作出した。作出した MAb はいずれもウエスタンブロット法、ELISA 法および免疫沈降法でプリオン蛋白質と反応した。エピトープ解析の結果、これらの単クローン抗体は連続するペプチド配列を認識するものと立体構造を認識するものに分類された。作出した抗体を用いた検出法の検討では化学発光 ELISA 法が良好であった。

【平成14年度】

○ プリオン病の病態解析と診断法の開発

i) 日本初の牛海綿状脳症の神経病理学的解析を行い、本症例が英国例と類似していることを明らかにした。

ii) 羊スクレイピーの野外発症例の病理学的解析では病理学的特徴の異なるスクレイピーを確認した。これらの羊をマウスへ伝達した結果、異なる病態及び病理学的特徴を呈するマウススクレイピー株が得られた。また、マウスの継代に伴って潜伏期の短縮とともに病変分布及び異常プリオン蛋白質の蓄積分布が変化することを明らかにした。

○ プリオン蛋白質の抗原構造解析及び抗体遺伝子の単利とその応用

単クローン抗体を用いてプリオン蛋白質 (PrP) の抗原構造の解析を行い、PrP にはきわめて多数のエピトープ領域が存在することを明らかにした。また、作出した抗体はPrPのC末端側球状ドメイン領域全体をカバーするパネル抗体であり、PrPの構造解析にきわめて有用であることを示した。さらに、PrPの異常化機構解析に用いる哺乳動物細胞での抗体遺伝子の発現系を開発するため、PrPの表面エピトープを認識する抗体遺伝子を単離した。

○ 異常プリオン蛋白質の高感度検出法の開発

i) プリオンを含む試料を抗プリオン抗体と反応させ、その後未反応抗体とプリオン抗原固相化マイクロビーズとの反応を検出することにより、試料中の異常プリオン蛋白質を定量する新しい手法 (flow microbeads immunocompetition assay) を開発した。本法はプリオンペプチドでは8アットモル (10^{-18} M) の超微量レベルの検出が可能で、スクレイピー感染マウス脳由来サンプルにおいても極微量のプリオンが検出された。

ii) 異常プリオン蛋白質を強力に分解する酵素を発見した。

【平成15年度】

○ プリオン病の病態解析と診断法の開発

リンタングステン酸により異常プリオン蛋白質が効率に濃縮されること、ポリマーを用いて未変性状態での異常プリオン蛋白質の固相化が可能との成果から、異常プリオン高感度検出のためのELISAが確立できた。また、プリオンの株の違いによる異常プリオン蛋白質のプロテイナーゼK断端の違いを明らかにした。スクレイピー chandler 株では、持続感染細胞株が作出できたが、スクレイピー obihiro 株では感染細胞株の作出には至っておらず、株の違いは細胞への馴化の程度にも影響していることを明らかにした。

BSE研究の主要成果（動物衛生研究所）

○学会誌等

研究成果のタイトル	著者名等	年・月	雑誌名等	巻(号),頁
Expression of cellular prion -related protein by murine Langerhans cells and keratinocytes	M. Sugaya (東京大), K. Nakamura (東京大), T. Watanabe (東京大), A. Asahina (東京大), N. Yasaka (帝京大), Y. Koyama (ニッピ), M. Kusubata (ニッピ), Y. Ushik (ニッピ), K. Kimura, A. Morooka, S. Irie, T. Yokoyama, K. Inoue (理研), S. Itohara (理研), K. Tamaki (東京大)	2002. 02	Journal of Dermatology Science	28, 126-134
Congenital spongiform changes in the brain stem nuclei of a domestic kitten	T. Morita (鳥取大), A. Shimada (鳥取大), T. Ishibashi (鳥取大), K. Kimura, M. Haritani, T. Umemura (鳥取大)	2002. 02	Journal of Comparative Pathology	126, 212-215
In situ detection of cellular and abnormal isoforms of prion protein in brains of cattle with bovine spongiform encephalopathy and sheep with scrapie by use of a histoblot technique	Kumiko M Kimura, Takashi Yokoyama, Makoto Haritani, Minoru Narita, Peter Belleby (VLA, UK), Julie Smith (VLA, UK), Yvonne Spence (VLA, UK)	2002. 05	Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	14, 255-257
Histopathological and immunohistochemical evaluation of the first case of BSE in Japan	Kumiko M Kimura, Makoto Haritani, Masanori Kubo, Shigeru Hayasaka (ChuOoh Livestock Hygiene Center of Chiba Prefecture), Akio Ikeda (ChuOoh Livestock Hygiene Center of Chiba Prefecture)	2002. 09	The Veterinary Record	151, 328-330
Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep	Altangerel Gombojav (帯広大), Naotaks Ishiguro (帯広大), Motohiro Horiuchi (帯広大), Dorj Serjmyadag (モンゴル農大), Badarch Byambaa (モンゴル農大), Morikazu Shinagawa	2003. 01	The Journal of Veterinary Medical Science	65, 75-81
Suceptibility of Transgenic Mice Expressing Chimeric Sheep, Bovine and Human PrP Genes to Sheep Scrapie	Altangerel Gombojav (帯広大), Ikuko Shimauchi (日ハム), Motohiro Horiuchi (帯広大), Naotaks Ishiguro (帯広大), Morikazu Shinagawa, Tetsuyuki Kitamoto (東北大), Ichiro Miyoshi (東北大), Shirou Mihri (九州大), Masuhiro Takata	2003. 03	The Journal of Veterinary Medical Science	65 (3), in press
異常プリオン蛋白質を分解する新規酵素	村山裕一、吉岡都、三浦克洋、三輪岳宏（明治製菓）、黒川知（明治製菓）、西沢耕治（明治製菓）	2003. 09	動物衛生研究成果情報	2, 13-14
我が国初発の牛海綿状脳症（BSE）牛の脳の病変分布および異常プリオン蛋白質の蓄積分布	木村久美子、播谷亮、久保正法、齋藤正恵、谷村信彦、早坂成郎、池田章夫	2003. 09	動物衛生研究成果情報	2, 41-42
Two different scrapie prions isolated in Japanese sheep flocks	Y. Hirogari, M. Kubo, K. M. Kimura, M. Haritani, T. Yokoyama	2003. 11	Microbiology and Immunology	47, 871-876
日本の羊スクレパーから分離した2種類のプリオン株	広野康裕、久保正法、木村久美子、播谷亮、横山隆	2004	動物衛生研究成果情報	印刷中
Preliminary evaluation of the prevalence of BSE in Japan	T. Tsutsui, I. Yamane, K. Shimura	2004. 02	The Veterinary Record	154, 113-114.
Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein	Hiroko Hayashi, Masuhiro Takata, Yoshifumi Iwamaru, Yuko Usiki, Kumiko M. Kimura, Yuichi Tagawa, Morikazu Shinagawa, Takashi Yokoyama	2004. 05	The Journal of Veterinary Medical Science	66, 515-520

○特許

名称	出願人	特許出願日
異常プリオン蛋白質の検出方法	三浦克洋、村山裕一	H13. 10. 15 2001-316541
難分解性蛋白質を分解する新規なプロテアーゼ	三浦克洋、村山裕一、吉岡都、三輪岳宏、西沢耕治、林淑恵	H14. 10. 24 2002-309248
超音波自動反応装置	水野喜夫、三浦克洋、村山裕一、井戸幸吉	H16. 1. 30 2004-024190