

牛海綿状脳症 (BSE) スクリーニング検査について

田邊輝雄¹, 野波正浩¹, 小野寺佳隆¹, 池隆雄¹, 藤井三郎¹

Screening test for Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)

Teruo TANABE, Masahiro NONAMI, Yoshitaka ONODERA, Takao IKE, Saburo FUJII

Abstract : Screening test for Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) was started on October 18, 2001. This test was performed by enzyme-linked immunosorbent assay using the PLATELIA ® BSE kit. During one and a half years from October 2001 to March 2003, all samples from 12,545 cattle examined in the Kyoto City Slaughter House were negative, but 38 samples were found to be false positive. The problems encountered in the testing, include poor-quality kits and breakable homogenizers. The report showed summary of the screening to date.

Key words : 牛海綿状脳症 Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, と畜場 slaughter house

I はじめに

平成13年9月10日, 日本国内にて, BSE 感染牛が初めて確認された。この事態を踏まえ, 国産牛肉の安全を確保するとともに国民の不安を解消する対策の1つとして, と畜場で処理される全ての牛を対象に BSE スクリーニング検査が行われることになり, 平成13年10月18日より全国の食肉衛生検査所において検査が開始された。それから1年半が経過し, これまでの当所における検査の現状や実績についてまとめたので報告する。

II 方法

検査キットにはプラテリア BSE キット (BIO-RAD 社) を用い, 厚生労働省の BSE スクリーニング検査要領¹⁾に基づき固相酵素免疫測定法 (ELISA) による検査を行っている。

1. 主な使用検査機器

安全キャビネット (三洋 MHE-130AB3)

電子天秤 (島津 BX-320H)

卓上細胞破砕機 (FastPrep FP120, マルチビーズショッカー MB524TMA)

アルミブロックヒーター (タイテック DTU-1C)

冷却遠心分離機 (トミー MX-300)

ボルテックス (Scientific Industries VORTEX-GENIE2)

マイクロプレートウォッシャー (マイクロプレートウォッ

シャー S 8/12J, パイオウオッシャー405)

マイクロプレートリーダー (Labsystems マルチスキャン JX)

2. 検査手順

1) 前処理

採取した延髄の門部分を含む部位よりサンプル採取用シリンジで採取し, $350 \pm 40 \text{mg}$ 秤量する。量り取った延髄をグライディングチューブに入れ, 細胞破砕機でホモジナイズする。乳化化したサンプルをシリンジで $500 \mu\text{l}$ 量り, マイクロチューブに移す。プロティナーゼ K 溶液を加え混和後, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 10 ± 1 分間反応させ, 正常プリオン蛋白を分解する。次に, クラリファイグソリューションを加え混和後, $20,000 \times g$, 5 分間遠心分離機にかける。上清を廃棄し乾燥後, 溶解液を加え, $100 \pm 1^\circ\text{C}$, 5 ± 1 分間反応させた後, ボルテックスにてよく混和, 沈渣を溶解し, 希釈液を加え混和したものを検体とする。

2) 異常プリオンの検出 (ELISA)

固相マイクロプレートに陰性コントロール4穴, 陽性コントロール2穴, 検体を1穴に各 $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し, フィルムで覆い $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 75 ± 15 分間反応させる。反応終了後, マイクロプレートウォッシャーで3回洗浄し, 酵素標識抗体液を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 分注し, $2 \sim 8^\circ\text{C}$, 60 ± 5 分間反応させる。反応終了後, マイクロプレートウォッシャーで5回洗浄し, 基質発色液を各 $100 \mu\text{l}$ 分注し, $18 \sim 22^\circ\text{C}$, 暗所で, 30分間反応させる。その後, 反応停止液を各 $100 \mu\text{l}$ 分注し, マイクロプレートリーダーで主波長 450nm , 副波

長620nmにおける吸光度（OD 値）を測定する。

3) 判定

判定は、陰性コントロールの平均吸光度に0.210を加えた値をカットオフ値としているが、精度を高めるためにカットオフ値の-10%以上の吸光度を示したサンプルを疑陽性検体と判定し、再検査として、残っている脳乳剤からプロティナーゼ K 溶液処理以降の工程をもう一度実施する。その際は1検体2穴で ELISA を行い、一方でカットオフ値の-10%以上の吸光度を示した検体はスクリーニング検査陽性と判定し、国の指定機関に検体を送付して、確認検査が行われる。

III 結果及び考察

1. 検査の現状について

BSE スクリーニング検査に担当するのは、牛の延髄採取に担当者を含めて4名体制のローテーションで行っている。表1より平成15年3月末までに検査頭数12,545頭、試験実施は261日であり、1日あたりの平均検査頭数は48.1頭（1～92頭）であった。

延髄採取開始からプレートリーダーによる測定結果が得られるまでの検査所要時間は平均6時間07分（3時間51分～9時間9分）である。ただし、平成13年10月18日は初めての検査で一つ一つの作業を細かく確認しながら慎重に少しずつ行っていたため所要時間についての集計からは除外した。また、延髄採取後から検査に取り掛かるまで時間の経過があった平成14年12月26日も集計データから除外した。月別でみると、検体数が同じ程度であれば、検査にかかる時間はある程度まで短縮してきていることがわかる。やはり検査開始当初は手技が不慣れであり、段取りが悪かったことが原因と考えられ、検査要員の技術レベルが安定した現在では、所要時間は落ち着いてきている。表2のように頭数別にみると頭数の多い時には検査工程の各段階に要する時間が増えることから所要時間は多くかかっているが、プリオン検出にかかる時間はそれほど大きな差がないことから、解体速度に左右される延髄採取や検体数によって数回に分けて行われる前処理に時間がかかることが明らかである。

2. 検査における問題点と改善策

1) 検査機器・検査キット

グライディングチューブの不良品による細胞破碎の不十分、破碎中のトラブル。

反応性のないプレートや陽性コントロールの不安定なキットの使用注意や使用自粛。

表1 月別検査所要時間(平成15年3月末まで)

年月	検査頭数	試験日数	平均検体数	所要時間
H13.10・11	895	21	42.6	7時間02分
12	874	14	62.5	6時間43分
H14. 1	694	15	46.3	6時間21分
2	620	15	41.3	5時間58分
3	776	16	48.5	6時間10分
4	834	17	49.1	6時間03分
5	639	13	49.2	6時間02分
6	685	16	42.8	5時間40分
7	810	18	45.0	5時間57分
8	743	14	53.1	6時間11分
9	623	14	44.5	5時間46分
10	702	16	43.9	5時間47分
11	995	17	58.5	6時間19分
12	997	17	58.6	6時間24分
H15. 1	506	11	46.0	5時間48分
2	552	12	46.0	5時間51分
3	600	15	40.0	5時間31分
全体	12,545	261	48.1	6時間07分

*所要時間は検体採取開始からリーダー測定まで。

*所要時間はH13.10.18, H14.12.26のデータを除き、H15.3.10の1回目を含んで算出。

表2 頭数別検査所要時間(平成15年3月末まで)

検査頭数	試験日数	プリオン検出	所要時間
1～12	9	3時間07分	4時間31分
13～24	22	3時間01分	4時間58分
25～36	46	3時間06分	5時間25分
37～48	43	3時間07分	6時間05分
49～60	65	3時間12分	6時間22分
61～72	54	3時間14分	6時間45分
73～90	17	3時間18分	7時間10分
91～	3	3時間18分	7時間38分
全体	259	3時間10分	6時間07分

注) H13.10.18及びH14.12.26のデータを除いて算出

卓上細胞破碎機の故障及び連続使用時の温度上昇による検体への影響。

ヒートブロックでのプロティナーゼK反応37℃インキュベーションの不十分。

プレートウォッシャーのノズルの不具合による洗浄不足。

2) 検査環境

検査室内の冬場の温度低下と夏場の上昇。

狭く作業しにくい検査室。

キット及び試薬の温度管理。

3) 検査員

検査開始当初は技術的な差がみられた。

検査要領において、検体量や反応時間など幅のあるものの場合、検査員によって解釈が一定ではなかった。

前記のような問題に対し、以下の点で改善を行った。

キットについては不良品のチェックを厳しく行うこととした。

細胞破碎機を2回かけるなど十分な破碎を行い、連続使用時には機器内を冷却することとした。

プレートウォッシャーは使用前後に精製水を流し十分な洗浄を行うこととした。また、陽性コントロールの隣のウエル (2-E) で疑陽性が続いたことから、2列目のストリップは空けて作業することにした。さらに1列目の陽性コントロール直下のウエル (1-G 及び1-H) も通常使用しないことにした。

37℃のインキュベーションは温度上昇テストを実施し、ヒートブロックのホールに予め水を入れることでチューブとの接着面を増やし、37.8℃と高めに設定することで検体が37±1℃に早く到達するようにし、さらに10±1分の反応時間を11分で行うことで酵素反応を十分行うようにした。

検査室内は24時間エアコンで一定温度を保つようにした。作業中は体温や機器の熱で温度が上昇することから20℃とやや低めに設定した。

作業効率を上げるため、連続分注ピペッター及び八連ピペッターを導入した。

検査室は平成14年8月に改善し、作業をしやすくした。

これらの改善点を含め、所内における操作条件等を定めた検査マニュアルを作成し、それに基づいて検査を行っている。

3. 検査結果について

表3は平成15年3月末までの12,545頭、261日の検査を実施した結果である。再試験が行われたのは21回 (38頭) であり、疑陽性検出率は0.30%で、再試験実施頻度は12.4

日に1回であった。疑陽性検出率は検査が開始された平成13年度は0.70%で、14年度前半 (4～9月) は0.23%、後半 (10月～15年3月) は0.02%と徐々に減少した。疑陽性率が高かったのは平成14年1月と3月であり、3月には2頭がスクリーニング検査陽性となり、国立感染症研究所での確認検査でBSE陰性と判定された。

試験検査の有効性及び検体の判定基準となるコントロールについて、平成15年3月末までの総試験回数 (再試験回数含む。2プレート使用の際は2回とカウント) 286回において調査した結果を表4にまとめた。陽性コントロールの平均値は1.829±0.377 (1.005～3.248) であった。陽性コントロールはあらかじめ溶解し分注して-20℃に保存しておき、検査時に室温に戻して使用している。実施毎に多少のばらつきはみられたが、検査無効となる1.000未満はなかった。陰性コントロールの平均値は0.021±0.008 (0.010～0.200) であった。吸光度に高値があった2回を除けば0.010～0.041の範囲となる。陰性及び陽性コントロール値に高低がみられた日のコントロール値のデータは表5、表6のとおりである (ただし、陰性コントロールの高低はカットオフ値に基づいた)。また、表7は陰性コントロールの1つの吸光度が平均吸光度の140%以上を示した事例である。これまでに4回あり、そのうち3回は他の3つの吸光度でカットオフ値を算出したが、1回 (平成15年3月10日) は検査無効となる陰性コントロール値0.150以上を示したため、再度試験を実施した。

表3 月別検査実績 (平成15年3月末まで)

年月	検査頭数	キット数	試験日数	再試験回数	再試験検体数	疑陽性検出率
H13.10	157	3	6	0	0	0.00
11	738	9	15	1	1	0.14
12	874	11	14	3	5	0.57
H14. 1	694	9	15	3	7	1.01
2	620	9	15	2	2	0.32
3	776	10	16	5	12 (2)	1.55
H13年度計	3,859	51	81	14	27 (2)	0.70
4	834	11	17	3	3	0.36
5	639	9	13	1	5	0.78
6	685	9	16	0	0	0.00
7	810	11	18	1	1	0.12
8	743	9	14	0	0	0.00
9	623	9	14	1	1	0.16
10	702	9	16	0	0	0.00
11	995	12	17	0	0	0.00
12	997	12	17	0	0	0.00
H15. 1	506	7	11	0	0	0.00
2	552	7	12	1	1	0.18
3	600	9	15	0	0	0.00
H14年度計	8,686	114	180	7	11	0.13
合計	12,545	165	261	21	38 (2)	0.30

* () 内の数値はスクリーニング検査で陽性と判定され、確認検査が行われた検体数。
確認検査にてBSE陰性と判定された。

* 再試験回数は陽性判定が出てもう一度検査を実施した回数の集計。

* 再試験検体数はカットオフ値-10%以上で陽性と判定されたものについての集計。

* 平成15年3月10日に陰性コントロールの1つが0.150を超えたため39検体を再検査した。

そのため、1回目の検査結果で陽性判定が1検体あったが計上していない。

* 平成15年3月の申請頭数は599頭。

表 4 コントロール成績(平成15年3月末までの試験286回)

項目	N	平均値	最小値	最大値
陰性コントロール	1,144	0.021	0.010	0.200
陽性コントロール	572	1.829	1.005	3.248
カットオフ値	286	0.231	0.223	0.248

表 5 陰性コントロール高値及び低値の日のコントロール

日付	NEG①	NEG②	NEG③	NEG④	カットオフ	PO①	PO②	ロットNo.
140221	0.037	0.038	0.038	0.038	0.248	1.555	1.391	1L0031
131221	0.035	0.039	0.039	0.036	0.247	1.549	1.883	1K1028
131212 再	0.037	0.037	0.036	0.038	0.247	1.569	1.499	1K1028
131220	0.030	0.036	0.036	0.041	0.246	2.217	2.131	1K1028
141220	0.012	0.013	0.013	0.013	0.223	1.539	1.600	2F0007
140330	0.017	0.014	0.010	0.014	0.224	1.424	1.709	2A0001
141028	0.013	0.015	0.013	0.014	0.224	1.611	1.920	2F0007
140302	0.016	0.015	0.013	0.014	0.224	1.994	1.993	2A0001
140418	0.013	0.014	0.014	0.015	0.224	1.395	1.504	2A0001

表 6 陽性コントロール高値及び低値の日のコントロール

日付	NEG①	NEG②	NEG③	NEG④	カットオフ	PO①	PO②	ロットNo.
140128	0.022	0.021	0.020	0.019	0.230	3.270	3.248	1L0031
141005	0.021	0.021	0.021	0.021	0.231	3.115	2.928	2F0006
140914	0.016	0.019	0.017	0.023	0.229	2.656	3.038	2D0005
140603	0.020	0.020	0.020	0.021	0.230	1.095	1.005	2C0003
131018	0.019	0.020	0.018	0.018	0.229	1.161	1.008	1G0026

表 7 陰性コントロールのうち1つの吸光度が平均吸光度の140%以上を示した事例

日付	NEG①	NEG②	NEG③	NEG④	PO①	PO②	ロットNo.
140401	0.018	0.020	0.032	0.020	2.312	2.314	2A0001
140402	0.025	0.028	0.028	0.053	2.271	2.650	2A0001
140713	0.031	0.017	0.016	0.017	1.652	1.443	2D0004
150310	0.200	0.101	0.021	0.019	2.278	2.534	2K0009

＊H15.3.10の試験は陰性コントロール ≥ 0.150 のため、再度検査を実施した。

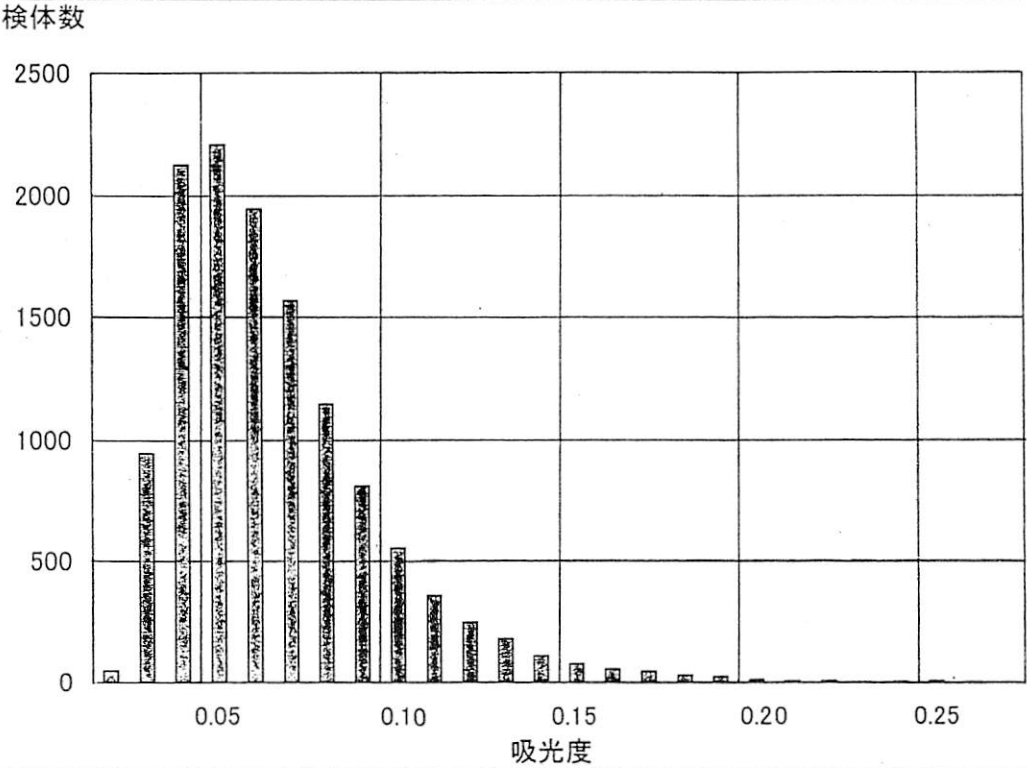


図 1 検体の吸光度分布

これまで実施した全12,545頭の検査結果の吸光度について検討を行い、図1にその分布をまとめた。吸光度の平均値は 0.071 ± 0.032 (0.004~0.419)であり、ピークは0.05台にあった。0.04~0.06台の値のものが全検体の半数を占めていた。吸光度が高い場合は再試験となるが、陰性コントロールに比べ明らかに低い値を生じた場合もその検体について再度試験を実施した。

性種別については表8にまとめたが、性別では牝が去勢牛に比べてやや高く、種別ではF1、ホルスタイン種が和牛に比べてやや高い値であった。当所に搬入された牛の月齢は平均30.5ヶ月(15~256ヶ月)であった。表9は月齢別にみたものであるが、4歳未満では差は認めなかったが、4歳以上の個体については明らかに吸光度が高かった。牝牛が高かったのは4歳以上の個体が多かったことによるものと考えられるが、吸光度が品種や年齢によって差が生じる理由はわからなかった。

また、検査を行っていく上で検査キットのロットによって測定結果の吸光度に差があると思われたので、ロット毎に集計した(表10)。ロットNo.1K1028において平均吸光度が明らかに高かった。検体の吸光度について0.1、0.15、0.2以上と区切ってその割合をみると、検査開始の頃に使った1G0026と1H0128に比べ、次の1K0128、1L0031及び2A0001は全体的に高いことがわかる。その後の2B0002、2C0003及び2D0004は最初の2ロットに近い傾向を示し、2D0005以降、平均吸光度はやや低めに推移している。当初は、吸光度の測定結果には気温の変動が影響し、冬季は高めに出ると思われたが、エアコンで室温を保つようにしてもあまり変化はなく、1年以上の検査を経て、キットのロットによる有意差であると解釈された。

陽性・再試験と判定された検体数は平均吸光度が0.121と最も高かった1K1028ではなく、吸光度が0.097と2番目に高かった2A0001で特に多かったことから、コントロール値及び検体の吸光度について検討した(表11)。これを

みると検体の吸光度だけでなくカットオフ値を決定する陰性コントロール値にも有意な差が認められた。1K1028では陰性コントロールの平均値が0.032と高いことから、カットオフ値が高くなり、陽性判定があまり多くはなかったが、2A0001の平均値は0.020と低く、カットオフ値が低くなり、検体吸光度の値の割には、陽性判定された検体が多かった。

さらに、検査実施日毎の差についても検討してみた。平成14年1月から2月にかけて1L0031のキットで行われた検査を頭数と吸光度についてまとめた(図2)。その日の検査頭数と検体吸光度との間に相関はみられなかった。また、3月の頭数も実施日も近い2例で比較してみると、試験実施日毎の検体吸光度に多少の差が生じた(表12)。この時点ではすでに検査開始から2ヶ月半が経過しており、作業手順や機器の調子に問題がないと考えれば、検査室の温度、微妙な反応温度の変化、試薬の温度や作成のタイミング、使用精製水、破砕や混和の不十分、プレート洗浄や水切りの不十分など細かい点での影響が考えられる。

表8 性種別検査成績(平成15年3月末日まで)

性種	検査頭数	平均O.D.	S.D.
和牡	2	0.085	0.021
和去	5,653	0.068	0.029
和牝	5,190	0.071	0.029
F1牡	2	0.124	0.026
F1去	758	0.076	0.028
F1牝	911	0.083	0.032
H去	27	0.073	0.046
H牝	2	0.089	0.025
全体	12,545	0.071	0.030

表9 月齢別検査成績(平成15年3月末日まで)

月齢	検査頭数	平均O.D.	S.D.
24未満	60	0.071	0.033
24以上 ~ 30未満	4,563	0.069	0.029
30以上 ~ 36未満	7,522	0.072	0.030
36以上 ~ 48未満	310	0.071	0.030
48以上	45	0.099	0.028
不明	45	0.059	0.031
全体	12,545	0.071	0.030

表10 ロット別検査成績及び検体のO.D.値の傾向(平成15年3月末日まで)

ロットNo.	キット数	検査頭数	使用期間	平均O.D.	S.D.	0.1以上(%)	0.15以上(%)	0.20以上(%)	PO判定数
1G0026	15	1,165	H13.10.18 ~ 12.11	0.075	0.025	17.8	1.2	0.2	2
1H0128	2	159	H13.12.1 ~ 12.3	0.077	0.019	10.1	0.6	0.6	0
1K1028	6	445	H13.12.11 ~ 12.21	0.121	0.033	60.0	16.4	1.3	4
1L0031	15	1,164	H14.1.5 ~ 3.4	0.087	0.027	24.7	2.8	0.7	8
2A0001	20	1,464	H14.2.23 ~ 4.20	0.097	0.036	37.7	8.3	1.3	16
2B0002	4	296	H14.4.22 ~ 4.30	0.079	0.019	17.9	0	0	0
2C0003	15	1,120	H14.5.7 ~ 6.27	0.074	0.027	11.7	1.9	0.4	5
2D0004	10	761	H14.6.22 ~ 7.19	0.077	0.024	14.5	1.6	0.1	1
2D0005	20	1,544	H14.7.22 ~ 10.10	0.052	0.015	1.4	0	0	0
2F0006	10	745	H14.9.28 ~ 10.29	0.062	0.019	3.8	0.3	0.1	1
2F0007	25	2,024	H14.10.28 ~ 12.26	0.054	0.015	0.9	0.0	0	0
2H0008	15	1,141	H15.1.6 ~ 3.3	0.049	0.014	0.8	0.1	0.1	1
2K0009	8	517	H15.3.4 ~ 3.31	0.064	0.019	5.6	0	0	0
全体	165	12,545		0.071	0.030	13.8	2.2	0.4	38

注)使用期間は使い始めた日から最後に使用した日まで。

2B0002はH14.1.26付事務連絡により使用見合わせとなった。

表11 ロット別コントロール及び検体の成績(平成15年3月末日まで)

ロットNo.	総試験回数	NEG 平均	PO 平均	カットオフ平均	総検体数	平均O.D.	S.D.	PO判定
1G0026	27	0.027	1.676	0.237	1,165	0.075	0.025	2
1H0128	4	0.028	2.297	0.238	159	0.077	0.019	0
1K1028	10	0.032	1.693	0.242	445	0.121	0.033	4
1L0031	31	0.023	1.784	0.233	1,164	0.087	0.027	8
2A0001	40	0.020	1.949	0.229	1,464	0.097	0.036	16
2B0002	5	0.021	1.841	0.230	296	0.079	0.019	0
2C0003	27	0.020	1.508	0.230	1,120	0.074	0.027	5
2D0004	17	0.019	1.711	0.229	761	0.077	0.024	1
2D0005	32	0.018	2.137	0.228	1,544	0.052	0.015	0
2F0006	17	0.021	2.270	0.231	745	0.062	0.019	1
2F0007	36	0.018	1.818	0.228	2,024	0.054	0.015	0
2H0008	26	0.018	1.406	0.228	1,141	0.049	0.014	1
2K0009	14	0.028	2.177	0.238	517	0.064	0.019	0
全体	286	0.021	1.829	0.231	12,545	0.071	0.030	38

注) 総試験回数は試験回数と再試験回数の合計。
90頭を超える日は2プレート使用しているので1試験で2回となる。

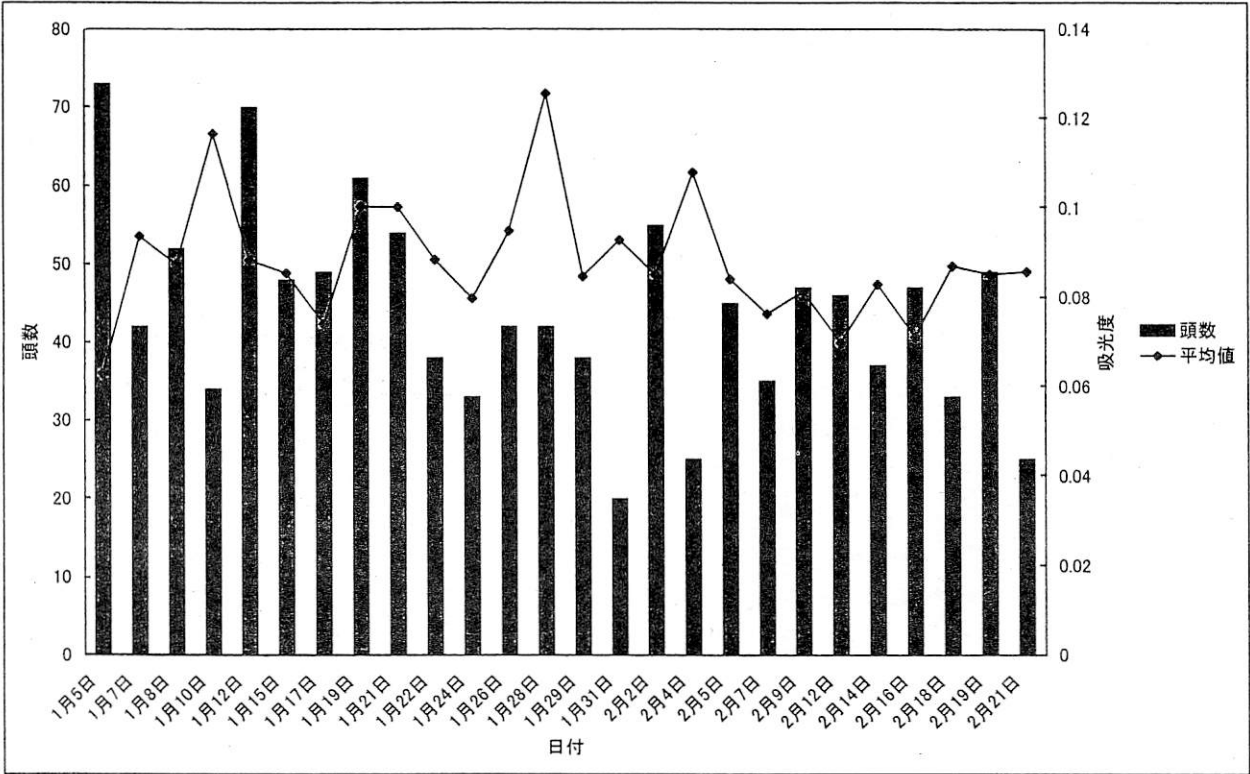


図2 吸光度の日差

表12 検査実施日での比較

日時	検査頭数	平均O.D.	S.D.
2002/3/11	46	0.118	0.033
2002/3/12	54	0.081	0.020
2002/3/16	63	0.140	0.046
2002/3/19	69	0.082	0.020

IV まとめ

BSE の国内発生から約1ヵ月後の BSE 全頭検査開始まで、検査室の確保、機器の整備、検査手技の習得、検査体制の確立、情報の収集など現場では混乱を極めた。さらに、検査開始以降も機器の不具合・故障やキットの欠陥品、疑

陽性の頻発など検査上の問題点が次々と発生した。それから1年半が経過したが、緊張感を保ったまま、検査は毎日行われている。現在まで、国内では7頭の BSE 感染牛の報告がされており、今後も感染牛が発見されることは十分考えられる。BSE が最後に検出された後、7年間陽性例がなかった場合に初めて BSE がいない清浄国と判定される

ことから、検査はしばらく続けられることになるであろう。食肉の安全を確保する体制は整ったが、食肉に対する不安は偽装表示問題などから、業界全体は非常に厳しい情勢となっている。さらに BSE の感染源ははっきり特定されておらず、BSE 対策は行われているものの様々な問題を抱えている。

我々は検査技術の向上や BSE 検査に関する情報の収集、他の検査所との情報交換などに努めていくことが大切である。

また、検査の上で様々なトラブルを想定した対応も考え

ておかねばならない。その一方、市民や業界に向けて BSE や食肉について情報の普及・啓発や検査についての取り組みを伝えていくことも必要である。

BSE 検査の実施にあたっては、当所においても BSE 疑似患畜や万一の発生に備えた万全の体制で検査に臨んでいかねばならない。

V 文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長：牛海綿状脳症に関する検査の実施について。平成13年10月16日，食発第307号（2001）

