

欧州委員会

保健・消費者保護総局
理事会 C－科学的意見

反芻動物組織中の TSE 感染性分布に関する報告書

(2001年12月における知見状況)

TSE/BSE 専門科グループにより作成され、

2001年12月13日の同グループ会合において完成

報告者 G.A.H.Wells 博士

反芻動物組織中の TSE 感染性分布に関する報告書

(2001年12月における知見状況)

目次

I.	委任	9
II.	反芻動物における TSE 感染性レベル	9
II.1.	以前のデータ一覧表	9
II.2.	発表データの背景	13
II.3.	ヒツジスクレイピー スクレイピー病原体に経口曝露及び自然曝露したヒツジの組織のマウス接種生物学的検定	14
II.4.	ウシ BSE-VLA 病原性試験において実験的に BSE を感染させて逐次殺処分したウシから採取した組織のマウス接種生物学的検定	15
II.5.	ウシ BSE-ウシ組織のウシ接種生物学的検定	18
II.6.	ヒツジ BSE-BSE 病原体に経口曝露したヒツジの組織のマウス接種生物学的検定	21
II.7.	結論	24
II.7.1.	ヒツジ (及びヤギ) の TSE	24
II.7.2.	ウシの BSE	24
III.	反芻動物頭部の安全性	27
III.1.	感染性と潜伏期間との関係	27
III.1.1.	ウシ	27
III.1.2.	ヒツジ	28
III.2.	齢に関係する因子	28
III.3.	屠殺プロトコールに関係する因子	29
III.4.	結論	30
IV.	謝辞	31
V.	参考文献	31
付属文書	自然発生スクレイピーの臨床的段階にあるサフォーク種ヒツジ及びヤギから採取した組織の感染性力価 (マウス生物学的検定) と、BSE 確定症例から採取した感染性力価との比較	32

I. 委任

科学運営委員会(SSC)は以下の要請を受けた。

- (1) 1999年7月22日・23日付けのヒツジの血統と遺伝子型分類に関するSSC意見書に示されたヒツジ組織感染性力価の表を最新の科学データに基づいて更新すること。
- (2) ウシに関する同様の表を既存のすべての科学的証拠に基づいて作成すること。
- (3) ウシ、ヒツジ、ヤギの骨格筋、舌及び関連の神経分布を含む頭部全体を特定危険部位(SRM)とみなすべきだとする1997年12月9日付けの特定危険部位一覧に関するSSC意見書採択以降、新しい証拠が得られたかを検討すること。

SSCはTSE/BSE特別部会に対し、上記要請に対する回答の基礎となる科学的報告書を作成することを求めた。この報告書を添え付ける。この報告書は、TSE/BSE特別部会が2001年12月13日の会合において最終的に承認したものである。

キーワード: ウシ海綿状脳症(BSE)、伝達性海綿状脳症(TSE)、特定危険部位(SRM)、ウシ、小型反芻動物、ヒツジ、ヤギ、頭部、舌、組織感染性

II. 反芻動物におけるTSE感染性レベル

II.1. 以前のデータ一覧表

サフォーク種ヒツジ及びヤギのスクレイピー臨床的症例から採取した組織の感染性分類(マウス生物学的検定で得られた感染性力価に基づく)に関して入手できるすべてのデータを示した最新の一覧表を1999年7月22日・23日に採択されたヒツジの血統及び遺伝子型分類の方針に関する意見書(EC1999年)の付属文書に示したが、この表を本報告書の表1に再録する。

ヒツジ(Hadlow他1982年)及びヒツジ/ヤギ(Hadlow他1980年)に関するデータとウシBSE自然発生例の組織に関する予備的マウス感染性データとの比較も行われている。この比較を付属文書に示す。ウシBSE症例の組織のうち報告書作成時においてマウス生物学的検定で感染性が検出されなかった組織のリストもKimberlin(1996年)によって示されている(表2参照)。BSE病原体に実験的に経口曝露したヒツジから採取した組織の感染性分類に関する予備的な表を、飼育条件下で小型反芻動物からBSEが検出された場合に備えた先制リスク評価に添付した報告書の付属文書3に示した(表3参照)。

表1 ヒツジ及びヤギにおける自然発生スクレイピー：各齢のサフォーク種ヒツジ及びヤギのスクレイピー前臨床的/臨床的症例の組織分類を Swiss 系マウスにおける病原体力価で示す⁵ (1999年7月22日・23日付け付属文書「ヒツジの血統及び遺伝子型分類の方針に関する意書」より修正を加えず再録) (EC 1999年)

グループ	感染性力価 (およその範囲)	前臨床的症例				臨床的症例	
		ヒツジ				ヒツジ	ヤギ
		≤8 ヲ月(0/16)	10-14 ヲ月(8/15) ⁶	25 ヲ月(1/13)	>25 ヲ月(1/6)	34-57 ヲ月(9/9)	38-49 ヲ月(3/3)
A	高 ≥4.0					脳、 脊髄	脳、 脊髄
B	中 3.2~4.0		近位結腸、 遠位回腸、 LN(RP/MP)、脾臓	近位結腸、 遠位回腸、 LN(RP/MP)、扁桃		近位結腸、遠位回腸、 脾臓、扁桃、LN(BM)、 LN(PF、陰性 1/9)、LN(PS、 陰性 2/9)、LN(PR/MP)、 (遠位直腸+)	近位結腸、近位回腸、 LN(BM)、LN(RP/MP)、 LN(乳房上)、下垂体、 (遠位直腸+)、脾臓
C	低 ≤3.2 又は 力価不明		LN(PS/PF)、扁桃	脳(髄質/間脳)、 LN(BM)、 LN(PS/PF)、 脾臓		副腎、骨髄**、遠位結腸、 CSF、肝臓**、LN(乳房上 ×2)、鼻粘膜、膝臓**、 下垂体、坐骨神経、 胸腺**、胎盤** ^o	副腎、遠位結腸、CSF、 鼻粘膜、坐骨神経、胸腺
D	検出されず	回腸、 LN(PS/PF)、 LN(RP/MP)、 胸腺、扁桃、脾臓	血餅、脳(髄 質)、遠位結腸、 糞便、LN(BM)、 血清	副腎、脳(中脳皮 質)、遠位結腸、 LN(乳房上)、 鼻粘膜、唾液腺、 脊髄、胸腺	初乳	血餅、胎仔、心臓、腎臓、 肺、乳腺、骨格筋、卵巣、 唾液、唾液腺、精子嚢、 精巣、甲状腺、子宮	血餅、骨髄、糞便、腎臓、 乳腺、乳、骨格筋、卵巣、 唾液腺、血清、子宮

(-/+) = (陽性症例数/検査症例数)

* = 組織 30mg 当りのマウス脳内 LD₅₀ の log10 値

+ = 分析は行わなかったが、リンパ網内系組織含量が高い

o = 他の試験で陰性

** = 微量又はきわめて微量

PF = 大腿前

PS = 肩前

RP = 咽頭後

MP = 腸間膜/門脈

CSF = 脳脊髄液

LN = リンパ節

BM = 気管支縦隔

⁵ Hadlow 他 (1979年、1980年、1982年)、Pattison 他 (1964年、1972年)、Groschup 他 (1996年) による。DRG については本文参照。

⁶ 更に感度の高い感染性測定法が使用されるようになってきたため、検査対象の年齢範囲が 10 ヲ月未満まで引き下げられると思われる。16 週齢のラムで扁桃の感染性が検出された例がある。胎盤はグループ C に分類されているが、力価は不明である。

表2 BSE 確定症例から採取した組織のうち、脳内及び腹腔内に接種したマウスの生物学的検定で感染性が検出されなかった組織
(Kimberlin 1996年より)

<p>神経組織</p> <p>脳脊髄液 馬尾 末梢神経 — 坐骨 — 脛骨 — 内臓</p>	<p>リンパ網内系組織</p> <p>脾臓 扁桃 リンパ節 — 大腿前 — 腸間膜 — 咽頭後</p>
<p>消化管</p> <p>食道 第二胃 反芻胃 (筋柱) 反芻胃 (食道溝) 第三胃 第四胃 近位小腸 遠位小腸 近位結腸 遠位結腸 直腸</p>	<p>生殖組織</p> <p>精巣 前立腺 精巣上体 精液囊 精液 卵巢 子宮小丘 胎盤葉 胎盤液 — 羊水 — 尿膜腔液 乳房 乳</p>
<p>その他の組織</p> <p>血液 — バフィーコート — 血餅 — ウシ胎仔 — 血清 骨髓 脂肪 (腸間膜) 心臓 腎臓</p>	<p>肝臓 肺 筋肉 — 半腱 — 横隔膜 — 最長 — 咀嚼 脾臓 皮膚 気管</p>

表3 ヒツジの実験的 BSE—潜伏段階別及び PrP 遺伝子型別の感染性の分布 (飼育条件下で小型反芻動物から BSE が検出された場合に備えた先制リスク評価の付属文書 3 (2001年2月8日・9日 SSCにより採択) [EC 2001年]を最近の実験結果 [本報告書 II.6.4 参照]に基づいて更新したもの)

感染力価	前臨床的症例		臨床的症例	
	ARR/ARR、ARR/ARQ	ARQ/ARQ	ARR/ARR、ARR/ARQ	ARQ/ARQ
高				脳 脊髄、脾臓
中		脾臓、リンパ節 [推定、 定量は行っていない]、 扁桃		リンパ節、扁桃
低				
PrP-res が検出されたが感染性の定量は行わず		腸、第四胃噴門洞		腸、第四胃噴門洞
検出されず	脳、脊髄、脾臓、 リンパ節、扁桃			

注 上記要約表は、この分野で現在入手可能な限られた研究結果に基づくものである。すべての参考文献を添付報告書に示す。この表に示す値は自然発生ヒツジ BSE に関する結果ではなく実験結果であり、不完全なデータ及び継続中の実験データが含まれることから、この表を使用する場合には注意が必要である。ただし、この表は存在し得るリスクの程度の目安として使用できる。新しい結果が得られた場合には、表の更新を行う。

ARQ/ARR 型又は ARR/ARR 型の個体では、BSE 接種 2 年後まで PrP-res は検出されていない。従って、PrP-res と感染性との間には相関性があるという仮説に基づく、このような遺伝子型の動物が感染した場合、感染後数年間の末梢組織感染性力価は感受性の高い遺伝子型の動物よりも低い (又は検出されない) と思われる。

II.2. 発表データの背景

TSE 感染性病原体の組織中濃度を求める生物学的検定は通常はエンドポイント力価測定を使用して行われ、これよりも正確度が落ちるが潜伏期間測定を使用して行われることもある。このような生物学的検定に最も多く使用されている実験モデルは近交系マウスである。マウスは最も実用的な生物学的検定モデルであるが、種障壁効果のためにヒツジ又はウシ組織における病原体濃度が過小評価される可能性がある。これまでの力価測定データは少数の例外を除いて Kärber (1931年) に従い \log_{10} ID₅₀ 単位の形で表されている。1単位の平均感染用量又は致死用量(ID₅₀)は、接種動物群の半数に疾患を伝達する感染性と定義される。試料の連続 10 倍希釈液 1mL を希釈群当り 20 匹のマウスに接種した場合 (1 匹当り 0.05mL)、接種した動物の 50% (20 匹中 10 匹) に疾患を伝達する希釈液の希釈度で 1 単位の ID₅₀ が表されることになる。連続 10 倍希釈液を使用した力価測定では、およそ 100%、50%又は 0%の伝達率が示されることが多く、最後の伝達率 0%の希釈液(限界希釈液)がわかれば、生存率を使用して希釈前の接種材料の ID₅₀ 単位を計算できる。この値は、通常、組織 1g 当りの ID₅₀ 単位の換算される。

げっ歯類を使用したエンドポイント力価測定及び潜伏期間測定の実験から、このような生物学的検定の再現性は使用する動物に適応させた病原体株 (その動物内でクローン化したものが望ましい) の感染性を調べた場合に最も高くなることが示唆されている点に注意する必要がある。C57B1 系マウスを使用したエンドポイント力価測定生物学的検定の試験室間再現性が、少なくとも ME7 スクレイパーについて証明されている (Taylor 他 2000 年)。一方、ウシ及びヒツジ組織の感染性評価に最近使用されているマウス力価測定は、ウシ又はヒツジからの一次接種が種障壁を挟んで行われている点で上記のような生物学的検定とは異なる。

感染性生物学的検定の有効性には多数の因子が影響を及ぼす。接種経路は感染力価及び用量反応曲線に影響する (Kimberlin 及び Walker 1978 年)。接種量も生物学的検定の感度に影響する。実際には、生物学的検定の実施上最も効率的な接種経路が選択されている。表 1 及び表 2 に示す生物学的検定の場合、マウス脳内(ic)接種によるスクレイパー感染性検出限界の計算値を接種量 30 μ L で計算すると、組織 1g 当りの ID₅₀ 値として約 $10^{2.0}$ (Kimberlin 1994 年) である。マウスに脳内投与できる接種材料の量は明らかに限られている。表 3 に示すように、BSE に自然感染したウシから採取した組織の感染性を測定するマウスアッセイでは (Fraser 及び Foster 1994 年、H. Fraser の私信)、ic 投与と ip 投与を組み合わせて合計 120 μ L が接種されており、検出限界は ID₅₀/g として $10^{1.4}$ であった (Kimberlin 1996 年)。

Fraser 他 (1992 年) は、RIII 系及び C57B1 系近交マウスに一次接種した BSE のエンドポイント力価測定値から求めた感染はどちらの系統でもほぼ同等であることを示した。

潜伏期間と力価との関係に対し多くの研究者が疑問を示しており (概要については Masel 及び Jansen 2001 年を参照)、潜伏期間測定による力価推定の妥当性が疑問視されている。スクレイパーに感染したマウスの脳から得た接種材料に対して一定の物理的・化学的処理を行うと同じ力価でも潜伏期間が変化し、エンドポイント力価測定と潜伏期間測定との間には ID₅₀ としておよそ $10^1 \sim 10^2$ の差が生じる (Masel 及び Jansen 2001 年)。マウスを使用して 100 回を超えるスクレイパー感染性力価測定を行ったある分析では (McLean 及び Bostock 2000 年) 用量対数値の減少に伴って平均潜伏期間が線形に延長することが明らかにされたが、潜伏期間のばらつきも用量減少に従って線形に増加した。従って、用量反応曲線から推定した力価の正確度は低用量では低くなる。

感染性（測定法によって異なる）と PrP^{Sc} 濃度との定量的相関性が乏しかった例は多数あるが（Masel 及び Jansen 2001 年）、PrP^{Sc} 濃度と TSE 感染性との関係性を証明する報告も発表されている（概要については Lee 他 2001 年を参照）。スクレイピーに罹患したサフォーク種のヒツジから採取した脳、脾臓、リンパ節及び胎盤についてマウス生物学的検定（Rocky Mountain Swiss 系マウス）で得られた結果と PrP 免疫プロット法で得られた結果を比較した場合、「感染性と PrP-res との間に完全な相関性が認められた」（Race 他 1998 年）。ただし、このような相関性が見られたのはマウスアッセイで得られた罹患率データと相対潜伏期間（すなわち、用量反応曲線に従う校正を行わない潜伏期間）及び PrP-res の有無との間に限られていた。従って、この相関性は結局のところ基本的に定性的なものである。

CEA Elisa 試験の Bio-Rad バージョンを使用した PrP^{Sc} 迅速検出の成績とウシ BSE 症例の脳に関するマウス感染性力価測定データとの間には良好な相関関係が認められていることから、この種の迅速試験の結果から感染力価を推定できると期待される（Deslys ら 2001 年）。このような試験結果が得られているのは脳組織に限られており、中枢神経系組織以外の組織についてはまだ適切な迅速 PrP 試験技術がない。

しかし、時間のかかる生物学的検定の代わりに診断マーカー法として PrP^{Sc} 検出法が使用される例が増大する傾向にあることから、感染性データ自体が欠けている場合に感染性測定のための代替法として PrP^{Sc} 濃度測定を使用する価値について何らかの調査を検討するべきである。感染性に関する過去のデータのみに基づいてリスク評価を行う代わりにこのような代替法を使用してリスク評価を行えば、新しいデータからより正確な推定値を得られるであろう。ただし、この問題は本報告書の範囲外である。

ドナー動物種の感染性の検出感度を強化した遺伝子導入マウスを使用してデータが得られれば従来のマウスで行われた生物学的検定のデータと比較できると思われるが、このようなモデルからはまだ感染性力価データは得られていない（Buschmann 他 2000 年）。

TSE 症例の感染性の力価測定は、中枢神経系（特に脳）を中心として行われている。他の組織に関する最近のデータは、少数の実験から得られたデータに限られる。

II.3. ヒツジスクレイピー スクレイピー病原体に経口曝露及び自然曝露したヒツジの組織のマウス接種生物学的検定

経口経路でスピレイピーに実験的に感染させたヒツジの組織に関する新しい感染性力価データないし潜伏期間データは得られていない。スクレイピー自然感染例に関するデータは、脳組織の感染力価に限られている。サフォーク種ヒツジの臨床的スクレイピー症例から採取した脳のマウス感染性力価平均値は 10^5 (ic)ID₅₀/g（Hadlow 及びその他 1979 年）であったのに対し、スクレイピー病原体に対する組織プールの影響を調べる試験においてスクレイピーが疑われる症例から得た 2867 個の脳のプールに関するマウス感染性力価は $10^{4.1}$ ic ID₅₀/g であった（Taylor 他 1997 年）。ヒツジスクレイピー症例の脳のプールを使用してスクレイピー病原体に対するブタ経口曝露を行った後に複数の系統のマウスで測定した場合、感染性値は大きく異なった。IM 系マウスにおけるマウス(ic+ip)ID₅₀/g は $10^{3.7}$ であったのに対し、C57BL 系マウスでのマウス(ic+ip)ID₅₀/g は $10^{2.8}$ であった（S.A.C. Hawkins 私信）。

II.4 ウシ BSE-VLA 病原性試験において実験的に BSE を感染させて逐次殺処分したウシから採取した組織のマウス接種生物学的検定

この試験のデザインについては既報に説明がある (Wells 他 1996 年、Wells 他 1998 年)。簡単に述べると、1991 年に出生したフリージアン/ホルスタイン種のウシ 40 頭を BSE 歴のない農場から集め、BSE 症例 75 例から採取してプールした脳幹を 4 ヶ月齢時に 30 頭に対してそれぞれ 100g 経口投与した。10 頭に対しては投与を行わず対照とした。

臨床的症候の発症を検出するために、試験期間にわたってウシの臨床的モニタリングを行った。

6 ヶ月齢時及び、その後は 4 ヶ月間隔で 26 ヶ月齢時 (曝露 22 ヶ月後) まで、脳幹を投与したウシについては 3 頭ずつ、対照群のウシについては 1 頭ずつを殺処分した。その後、脳幹を投与したウシ及び対照群のウシを任意の時点で殺処分し、曝露 40 ヶ月後に最終の殺処分を行った。

組織を無菌的に採取し、マウス生物学的検定に供した。殺処分を行うごとに、主としてリンパ網内系(LRS)、末梢神経系(PNS)、中枢神経系(CNS)、消化管、横紋筋及び主要な内臓 (表 3.1、Wells 他 1996 年) を代表する 44 の組織から接種材料を調製した。接種材料はすべて 10%生理食塩水懸濁液として調製し、一部の組織については抗生物質を添加した。各採取時点で、病原体に曝露したウシから得た組織ごとに接種材料をプールした。対照ウシからも組織ごとに同様の方法で接種材料を調製した。試験接種材料と対照接種材料を脳内経路(20 μ L)と腹腔内経路(100 μ L)で近交系マウスに投与し、標準定性的生物学的検定による感染性を測定した。曝露 18 ヶ月後までに殺処分したウシから調製した接種材料は、RIII 系マウスと C57BL/6 系マウス的一方又は両方の系のマウスに接種した。

英国の VLA による BSE 病原性試験で得られた広範囲の組織をマウス (RIII 系と C57BL 系的一方又はその両方) に ic 経路及び ip 経路で接種する定性的生物学的検定が完了した (Wells 他 1996 年、1998 年、1999 年及び未発表データ)。陽性組織の感染性力価測定は行われていない。感染性が検出されなかった組織については、マウス(ic/ip) LD₅₀/g が 10^{1.4} 未満であったと言える。結果を表 4 にまとめる。

感染性が検出された組織のデータを更に解析して感染性力価の近似値を得るには、RIII 系マウス及び C57BL 系マウスに関する生存率、用量、潜伏期間のデータを使用しなければならない。このようなデータの解析はまだ完了しておらず、特に RIII 系マウスに関するデータ解析が進んでいない (G.A.H. Wells 及び S.A.C. Hawkins、未発表データ)。BSE 病原性試験で得られた組織のうち、RIII 系/C57BL 系マウス生物学的検定で潜伏期間データが得られているものについては、組織感染性力価の近似値が推定されている。これを表 4 に示す。現在入手できる値の大半は C57BL 系マウス生物学的検定に基づくものであり、この生物学的検定からは単一の実験に基づく用量反応曲線しか得られていないことから (ic 接種後の脳に関する曲線のみ)、これらの推定値はあくまでも暫定的なものである。近い将来、RIII 系マウス感染性生物学的検定による潜伏期間データが得られる予定であり、このデータが得られれば一連の用量反応曲線 (ic+ip 接種後) の要約データに基づいて感染性力価を推定できるであろう。しかし、これらのデータからは、病原性試験において陽性となった組織の大半について得られたきわめて低い推定感染性力価 (マウス ic+ip ID₅₀/g として 10¹ 未満) よりも高い精度で推定を行うことは不可能である (表 4)。

中枢神経系における感染性推定値がこのようにきわめて低かったのは、病原性試験において曝露 32~40 ヶ月後に殺処分したウシでも臨床的状態が比較的早期にあったことで説明できると思われる。BSE の前臨床的症例及び臨床的に BSE が疑われる症例の脳について行われた感染性力価測定では、広範囲の力価が得られている (マウス ic または ic+ip ID₅₀/g と

して $10^{2.9} \sim 10^{5.2}$) (Fraser 他 1992 年、Taylor 他 1994 年、Kimberlin 1996 年、G.A.H. Wells 及び S.A.C. Hawkins の未発表データ)。これらの力価のうち最高値は BSE 末期の単一症例の後脳から得られたものであり、最低値は臨床的に BSE が疑われる症例から採取したすべての脳のプールから得られたものであることから (陰性症例が 10%以上含まれる可能性がある)、このばらつきはサンプリング法の違いである程度説明できることを強調しなければならない。

表4 BSE 病原体に経口曝露し逐次殺処分したウシから採取した組織の感染性生物学的検定の要約 (G.A.H. Wells 及び S.A.C. Hawkins の未発表データ)

組織	感染性	感染性力価の推定範囲 (マウス ic/ip ID ₅₀ /g) と ドナーウシの潜伏期間 (括弧内)
神経系		
脳-前頭葉皮質、後髄	+, +	[C57BL] ≤ 10 ^{1.0} (32~40 ヶ月)
下垂体	-	
脳脊髄液	-	
硬膜	N.D.	
脊髄-C2~C3、T10~T11、L3~L4	+, +, +	[C57BL] ≤ 10 ^{1.0} (32~40 ヶ月)
下神経節	-	
背根神経節-C3~C6、T5~T8	+	[C57BL] ≤ 10 ^{1.0} (32~40 ヶ月)
三叉神経節	+	[C57BL] ≤ 10 ^{1.0} (32~40 ヶ月)
星状神経節	-	
坐骨神経	-	
顔面神経	-	
横隔神経	-	
挽骨神経	N.D.	
半腱筋	N.D.	
横隔膜筋	N.D.	
三頭筋	-	
咀嚼筋	N.D.	
胸骨頭筋	-	
最長筋	-	
消化器		
舌 (背側、粘膜を含む)	-	
顎下唾液腺	-	
耳下唾液腺	-	
前食道	N.D.	
反芻胃	-	
第三胃	N.D.	
第四胃 (幽門)	-	
十二指腸	-	
遠位回腸 (パイエル板を含む)	+	[R111] < 10 ^{0.5} ~10 ^{1.5} (6~14 ヶ月)、10 ^{1.2} (18 ヶ月)、 [C57BL] < 10 ¹ (36~40 ヶ月)
らせん状結腸	-	
糞便 [‡]	-	
脾臓	-	
肝臓	-	
リンパ網内系		
脾臓	-	
胸腺 (頸部)	-	
扁桃	-	
顎下リンパ節	-	
咽頭後リンパ節	-	
気管支縦隔リンパ節	-	
肝リンパ節	-	
腸間膜リンパ節	-	
肩前リンパ節	-	
膝腋リンパ節	-	
その他		
腎臓	-	
尿 [‡]	‡	
副腎	N.D.	
肺 (左尾葉)	-	
鼻粘膜 (中鼻甲介)	-	
心臓 [‡]	‡	
心臓 (左室/中隔)	-	
三尖弁 [‡]	‡	
大動脈 [‡]	‡	
血液 (パフィーコート)	-	
血液 (血清)	N.D.	
血液 (血餅)	N.D.	
骨髓 (胸骨)	+	[C57BL] < 10 ^{1.0} (38 ヶ月)
コラーゲン (アキレス腱) [‡]	-	
皮膚 [‡]	‡	
骨 (大腿骨幹) [‡]	-	

表4の注

- + 陽性
- 陰性 (マウス (ic+ip) log₁₀ LD₅₀/g で 10^{1.4}以下)
- N.D. 検査せず (採取し、後の試験用に保存)
- ‡ 2回の殺処分時 (曝露 18 ヶ月後及び 32 ヶ月後) にのみ一定の R111 系マウス生物学的検定を行った。
- この試験 (Wells 他 1999 年) で曝露したウシの臨床的徴候の発症期間 (潜伏期間終了後) に入る 1 回の時点 (曝露 38 ヶ月後) にのみきわめて低い感染性が検出された。

II.5. ウシ BSE—ウシ組織のウシ接種生物学的検定

ヒツジのスクレイピー症例では広範囲のリンパ組織で感染性が検出されたが、それとは対照的にウシ自然発生 BSE 症例の Maus 生物学的検定では中枢神経系以外の組織から感染性を検出できなかったことから、BSE 病原体検出に関するこの生物学的検定法の有効性が問題となった。そのため、種障壁を挟んで Maus で分析した組織感染性力価が過小評価されていることを示す指標を求め、ウシ及び Maus への一次接種による感染性力価測定を同時に行うことによりウシ BSE 症例から採取した脳の感染性に関する近似的な用量潜伏期間曲線を作成する試験 (VLA/CSG SE1821) を行った。更に、BSE 自然発症例から脾臓及びリンパ節を採取してウシ生物学的検定を行い、これらの組織の感染性濃度の桁を推定した。

ウシ BSE 症例から採取してプールした脳幹から接種材料を $10^3 \sim 10^8$ の範囲で 10 倍希釈し、各希釈液をウシの 4 ヶ月齢群に脳内(ic)接種した。他の 2 群のウシには脾臓又はリンパ節プールの 10^{-1} 希釈液を同様の方法で接種した。ウシの臨床状態を臨床的疾患を示す確定的徴候が生じるまでモニタリングし、その後殺処分して脳の検査を行って BSE の形態的表現型を確認し、免疫組織学的検査により疾患特異的 PrP の有無を評価した。これと平行して、sinc⁶⁷(RIII) 系 Maus における感染性力価測定を、標準 Maus エンドポイント力価測定プロトコールに従って $10^{-1} \sim 10^{-6}$ の希釈範囲で行った。最大の分析効率を得るために、Maus には ic 経路と腹腔内(ip)経路を同時に使用して接種を行った。

脳感染性力価は Maus (ic+ip) では $10^{3.3}$ ID₅₀/g、ウシ(ic)では $10^{6.0}$ ID₅₀/g であった。従って、BSE 組織の感染性力価を種障壁を挟んで Maus で測定すると 500 倍過小評価されることになる (G.A.H. Wells 及び S.A.C. Hawkings の未発表データ)。相対力価で表すと、Maus (ic/ip) における LD₅₀/g 値 10^0 が、ウシ(ic)における LD₅₀/g の $10^{2.7}$ に相当する。すなわち、Maus 生物学的検定の検出限界 (Maus [ic/ip] LD₅₀/g として約 $10^{1.4}$) はウシ(ic) LD₅₀/g の $10^{4.1}$ に相当する。最初の病原体試験で得られた一定の組織の生物学的検定をウシ脳内接種を使用して更に行ったが、これまでのところ感染性が確認されたのは Maus 生物学的検定ですでに陽性が示された組織に限られている (表 5—G.A.H. Wells 及び S.A.C. Hawkings の未発表データ)。

Maus 生物学的検定の感度が比較的低かったことは、BSE では広範な LRS 感染性が明らかに欠けていることで説明できるかもしれないが、BSE 末期のウシ臨床歴症例 5 例から採取しプールしたリンパ節 (咽頭後、腸間膜、膝窩) 又は脾臓を脳内接種して行った生物学的検定の結果はこの仮説は裏付けるものではない。この試験における生存率データから、組織感染性濃度はウシ(ic) LD₅₀/g として少なくとも 1 未満であり、おそらく 0.1 未満であると思われる。

表5 BSE 病原体に経口曝露したウシから採取した組織をウシ（接種群当り 5 頭）に脳内接種して行った生物学的検定（病原性試験）一組織を採取したウシの逐次殺処分時点ごとの接種材料の詳細、接種材料及び潜伏期間

接種材料（曝露後経過月数）	接種日	2001年8月29日までの生存期間 ⁴ （月）
骨格筋 ¹ （曝露 18 ヶ月後）	1996年10月18日	59
肝臓（曝露 18 ヶ月後）	1996年11月4日	59
腎臓（曝露 18 ヶ月後）	1996年11月6日	59
遠位回腸（曝露 18 ヶ月後）	1996年11月7日	平均潜伏期間 24 ヶ月(5/5 ⁵)
骨格筋 ¹ （曝露 32 ヶ月後）	1996年11月11日	58
肝臓（曝露 32 ヶ月後）	1996年11月13日	58
腎臓（曝露 32 ヶ月後）	1996年11月14日	58
末梢神経 ² （曝露 32 ヶ月後）	1996年12月9日	57
パフィーコート（曝露 32 ヶ月後）	1996年12月12日	57
後髄/脊髄（曝露 32 ヶ月後）	1998年2月23日	平均潜伏期間 23 ヶ月(5/5)
遠位回腸（曝露 32 ヶ月後）	1998年2月25日	43
後髄/脊髄（曝露 22 ヶ月後）	1998年2月27日	43
胸腺（曝露 6 ヶ月後）	1998年4月6日	41
遠位回腸（曝露 10 ヶ月後）	1998年4月8日	平均潜伏期間 22 ヶ月(5/5)
皮膚（曝露 32 ヶ月後）	1998年4月24日	41
後髄（曝露 10 ヶ月後）	1998年4月27日	41
後髄/脊髄（曝露 26 ヶ月後）	1998年4月30日	41
脊髄（曝露 10 ヶ月後）	1998年5月28日	40
脾臓（曝露 10 ヶ月後）	1998年7月9日	38
扁桃（曝露 10 ヶ月後）	1998年8月27日	37
胸腺（曝露 10 ヶ月後）	1998年9月1日	37
腎臓（曝露 6 ヶ月後）	1998年9月4日	37
肝臓（曝露 6 ヶ月後）	1998年9月21日	36
骨格筋（曝露 6 ヶ月後）	1998年9月22日	36
局所リンパ節 ³ （曝露 6 ヶ月後）	1998年11月24日	34
末梢神経 ² （曝露 6 ヶ月後）	1998年11月26日	34
パフィーコート（曝露 6 ヶ月後）	1998年11月30日	33
脾臓（曝露 6 ヶ月後）	1998年12月2日	33
扁桃（曝露 6 ヶ月後）	1998年12月3日	33
遠位回腸（曝露 6 ヶ月後）	1998年12月22日	平均潜伏期間 27 ヶ月(5/5)
腸間膜リンパ節（曝露 6 ヶ月後）	1998年12月23日	33
後髄（曝露 6 ヶ月後）	1999年1月5日	32
脊髄（曝露 6 ヶ月後）	1999年1月7日	32
末梢神経 ² （曝露 18 ヶ月後）	1999年1月11日	32
パフィーコート（曝露 18 ヶ月後）	1999年1月12日	32
局所リンパ節（曝露 18 ヶ月後）	1999年1月13日	32
唾液腺（曝露 18 ヶ月後）	1999年1月19日	32
皮膚（曝露 18 ヶ月後）	1999年1月21日	32
腸間膜リンパ節（曝露 18 ヶ月後）	1999年1月26日	32
脾臓（曝露 18 ヶ月後）	1999年1月28日	31
扁桃（曝露 18 ヶ月後）	1999年2月2日	31
後髄（曝露 18 ヶ月後）	1999年2月9日	31
脊髄（曝露 18 ヶ月後）	1999年2月10日	31
骨格筋 ¹ （曝露 26 ヶ月後）	1999年2月11日	31
局所リンパ節（曝露 26 ヶ月後）	1999年2月12日	31
肝臓（曝露 26 ヶ月後）	1999年2月16日	31

表5 BSE 病原体に経口曝露したウシから採取した組織をウシ（接種群当り 5 頭）に脳内接種して行った生物学的検定（病原性試験）—組織を採取したウシの逐次殺処分時点ごとの接種材料の詳細、接種材料及び潜伏期間（続き）

接種材料（曝露後経過月数）	接種日	2001年8月29日までの生存期間 ⁴ （月）
腎臓（曝露 26 ヶ月後）	1999年2月18日	31
遠位回腸（曝露 26 ヶ月後）	1999年2月19日	31
末梢神経 ² （曝露 26 ヶ月後）	1999年2月22日	31
パフィーコート（曝露 26 ヶ月後）	1999年2月23日	31
唾液腺（曝露 26 ヶ月後）	1999年2月25日	31
皮膚（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月1日	30
腸間膜リンパ節（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月2日	30
脾臓（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月10日	30
扁桃（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月11日	30
後髄（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月15日	30
脊髄（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月16日	30
骨髄（曝露 32 ヶ月後）	1999年3月18日	30
骨髄（曝露 22 ヶ月後）	1999年3月24日	30
骨髄（曝露 36 ヶ月後）	1999年3月29日	29
骨髄（曝露 26 ヶ月後）	1999年3月31日	29
尿（曝露 18 ヶ月後）	1999年8月17日	25
瞬膜（野外症例材料）	2000年3月13日	18

¹ 半腱筋、最長筋及び咀嚼筋のプール

² 坐骨神経及び撓骨神経のプール

³ 肩前リンパ節及び膝窩リンパ節のプール

⁴ 実験に残っている動物の生存期間は四捨五入した月数で示す（本文参照）

⁵ 臨床的疾患を発症したウシの頭数/接種頭数

ウシ BSE 症例の脳組織プールをウシに脳内接種して行った感染力価測定から用量潜伏期間曲線が得られる。この曲線を用い、組織の潜伏期間に対応させることにより接種材料の感染性力価の近似値が得られると思われる。病原性試験で得られたウシ組織に関する生物学的検定から今日までに得られているデータに基づく、感染性が認められる組織は遠位回腸（曝露 6 ヶ月後、10 ヶ月後、18 ヶ月後）及び脳幹/脊髄（曝露 32 ヶ月後）である。これらの曝露後時点における組織の平均潜伏期間とウシ感染力価測定から得た用量潜伏期間曲線から推定すると、感染力価はそれぞれ $10^1 \sim 10^2$ （6 ヶ月後）、 10^4 （10 ヶ月後）、 10^3 （18 ヶ月後）、 $10^3 \sim 10^4$ （32 ヶ月後）であると思われる。マウス生物学的検定では遠位回腸の感染性力価は曝露 6 ヶ月後及び 10 ヶ月後に上昇し（平均潜伏期間が低減）、曝露 18 ヶ月後のウシから採取した遠位回腸をマウスに接種した場合にはこの上昇が頭打ちになったという点で、この結果は RIII 系マウス潜伏期間に関するデータにきわめて近い。しかし、ウシで得た感染性データとマウスで得た感染性データの間には最大で $1 \log_{10}$ の差が認められた。

このウシ生物学的検定で接種を受けたウシの生存期間について現在入手できるデータを検討すると（表 5）、他の組織群において感染性は、存在するとしても大半はウシ(ic) ID_{50}/g として 10^2 未満であり、感染力価がきわめて低い群も存在することは明らかである。ウシ組織の感染性分類に関する暫定要約を表 6 に示す。