

酬を移動させ、最終的に取りだし口から獲得する方法を学習させたうえで、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテスト（24 試行）を2日連続で実施し、成功率を長期記憶の評価とした。

脳波は塩酸ケタミン-キシラジン混合麻酔下において、6 電極誘導による皮質脳波の測定および誘発脳波の測定を行った。視覚誘発脳波はフラッシュを用いランダムおよび、繰り返し刺激により誘発される脳波を測定した。聴覚脳幹部誘発電位はクリック音を用い、各強度の音圧における脳波を測定した。体性感覚誘発電位は正中神経手根部に電気刺激を行うことにより発生する脊髄および大脳感覚野の誘発脳波を測定した。

#### （倫理面への配慮）

BSE-P 接種動物はすべて改良型の P3 アイソレータケージ内に收容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚、聴覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするよう改良した。また、材料採取および脳波測定においては麻酔下において実施した。

### C. 研究結果および考察

#### 1. 体重変化

今回実験に供したカニクイザルは成長期にあたり、BSL3 指定実験室におけるアイソレータ内という特殊飼育環境下における実験と行動解析を行っていくうえで無処置対照ザルにおいて実験を進めている。接種は生後 740 日から 860 日に実施しているが、接種群においてはコントロールの 1 頭に比べて接種後の体重増加率が低い傾向が認められた（図 1）。

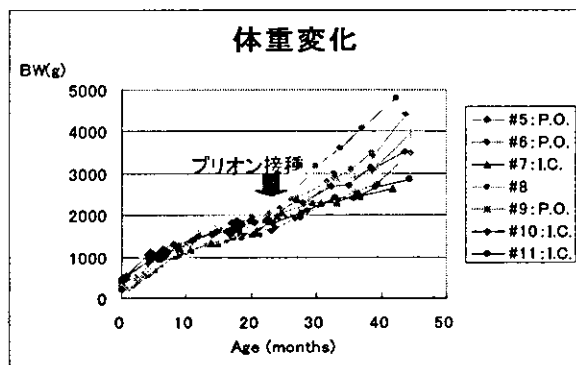


図 1

### 2. 行動観察（BSE-P 接種による行動異常の発現評価）

#### 1) 律動運動：

移動、旋回、振り子などの律動的運動の生起率には BSE-P 接種の有無で差はなかった。感染・疾病の進行を示唆する異常行動（神経制御異常）は一般に中枢神経の異常の初期に見られ、進行時には頻度の増大（運動休止期の短縮）、運動速度の高進、体幹と頭部の位置関係の異常：頭部の安定、両眼の水平維持が保たれない傾向（頭を上下に大きく動かす、下あごを先行させて旋回運動を行なう、頭部を下げて旋回を行なう）が認められることが知られているが、今年度の観察では特徴的な変化は見られなかった。

#### 非律動性運動：

- a) 姿勢：駐立姿勢、座位、ケージの上にとぶら下がるなどの姿勢、また尾などで見られる筋緊張などには顕著な変化は見られなかった。
- b) 眼球運動：体位と眼球の位置、定位にあるときの眼球の位置変動の大きさ、その頻度、視線、これらはサルの精神状態を評価するには有用な指標となりうるが BSE-P 接種後 15 ヶ月目までは著しい異常は認められなかった。
- c) 口：口をあけて、歯をむき出して威嚇する、ケージの前面（透明）をなめる、もぐもぐとものを食べているように口をしきりに動かす、腕、後肢の指をくわえる、上腕、大腿部をかじる
- d) 頭部、頭の震顫、足でかく。

これらは、サルの中枢神経の異常状態を評価する情報になりうる。

一般に症状が進行（接種からの時間経過とともに）、頭が固定されているときの眼球の特に水平方向への眼球振動が多くなる、頭部の運動と眼球の運動の分離が著しくなる。口を大きく開けて、ケージの錠前の部分をかじる（正常な場合、指でいじることが多い）、前面の透明な部分をなめるなど、手で行っていた行動を口で行なうようになったと考えられる行動が多くなる、体の一部を口にくわえる行動が時間経過とともにかじるような運動になり、後肢、臀部をかじろうとして旋回運動を行なうのが観察される。個体によっては頭部の震顫が見られた。

以上をまとめると今回観察された異常行動としては

- 1：律動性の頻度が増し、同じ姿勢を維持する時間が短縮する。
  - 2：頭と体幹の位置関係が変化する。下顎の運動が旋回運動に先行する、頭が下がる・
  - 3：垂直な旋回運動が多く見られるようになる。
  - 4：駐立、座位時に視線（眼球運動）の目的のない運動が顕著になる。
  - 5：体の一部を強くかむ（自傷行動）が出現する。
- などの行動異常が認められた。これらが行動観察による神経機能評価基準として有用と考えられ、今後経過を追って評価していく予定である。

2) 指迷路試験（記憶能）・アップル試験(運動能)  
アップルテストにおいては接種後 16 ヶ月目まで報酬獲得時間に異常は認められなかったことから、運動機能の異常は発現していないと考えられた (図 2)。

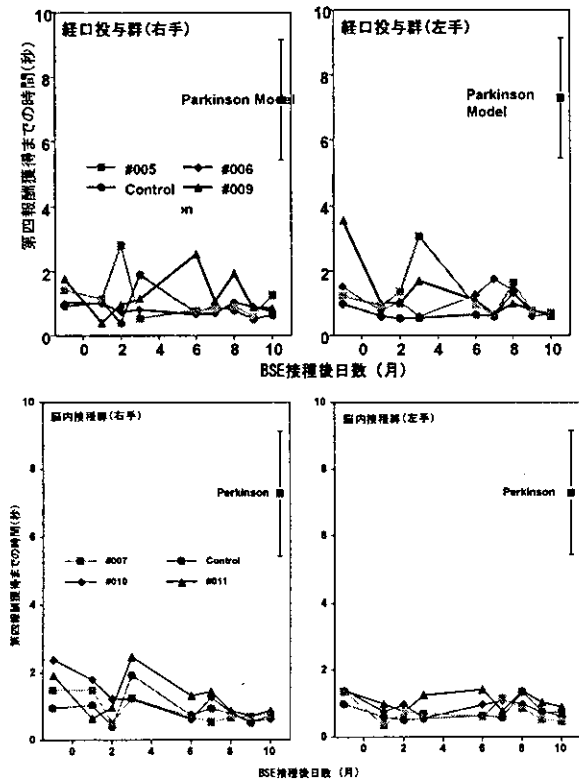


図2 アップルテストにおける第4報酬獲得までに所要した時間

指迷路試験の成功率においては有意な変化は認められなかった (図 3) が、各試行における到達までの時間解析において、到達時間には個体差があるが、経口投与 (# 5) および、脳内接種 (# 7) のそれぞれ1頭で14週以降に3段、4段目

に置いた課題の獲得までの時間が遅延する傾向があった (図 4)。ビデオ上では成功までのプロセスで迷いが生じているように思われた。アップルテストでの遅延が認められなかったことから、運動機能の異常ではなく思考における異常を抽出しているものと推測された。

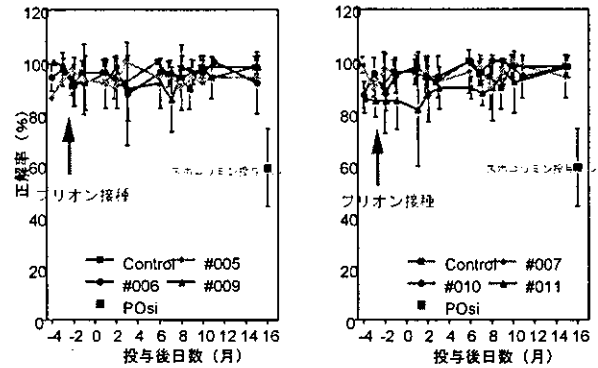


図3 指迷路試験による高次脳機能評価 (正解率)

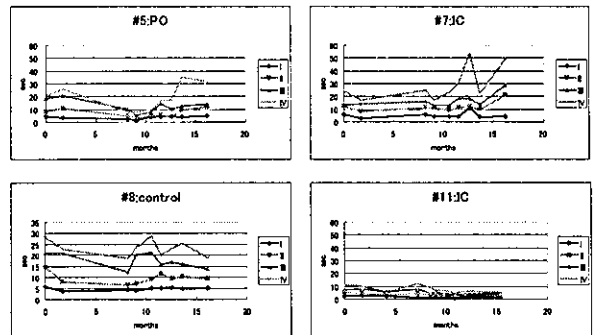


図4 指迷路試験による高次脳機能評価 (成功までの所要時間)

## 2. 電気生理学的解析

### 1) 皮質脳波

皮質脳波について①基礎律動の変化 (速波、徐波化)、②非突発波の評価 (PSD、SD)、③異常脳波の出現 (棘・鋭波、棘鋭・徐波複合) ④部位による著しい違いについて評価を行った。BSE-P接種により脳機能の異常を反映していると考えられる顕著な傾向は認められていない。しかし、6頭中3頭で脳波の徐波傾向が観察された。今後、この脳波の評価の精度を上げるとともに、周波数解析による客観的評価を行っていくこととする。

### 2) 誘発脳波

経口接種を行った # 6 においてわずかに視覚誘発電位、聴覚誘発電位においてわずかに振幅の低下と潜時の延長が観察された (図 5)。

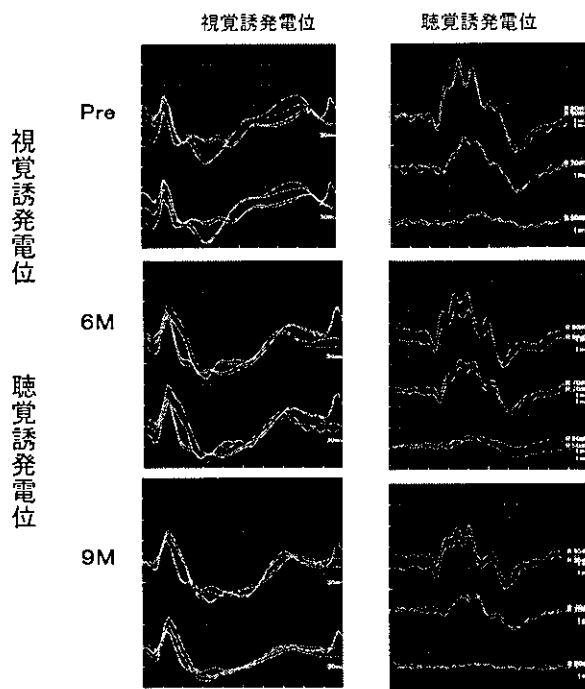


図5 BSE経口投与カニクイザルの誘発脳波

#### D. 結論

若齢カニクイザルに BSE-P を経口および脳内に投与し、定期的に採材した血液、尿、脳脊髄液を研究班共通の体内動態解析用研究資源として提供した。BSE-P を経口および脳内に投与したカニクイザルについて、継時的に脳波測定、行動解析、記憶能解析を行った結果、接種後 15 ヶ月目において、行動観察では律動運動において多動性、旋回運動の頻度が高い傾向が認められた。非律動運動では目的のない眼球振動や搔痒感が観察された。高次脳機能評価系として行っている指迷路試験では、成功率に著しい変化は認められなかったが、一部の個体で 4 段迷路において成功に所要する時間の延長が観察された。アップルテストでは著しい変化が認められなかったことから、運動機能の異常ではなく思考における異常を抽出しているものと考えられた。皮質脳波では 6 頭中 3 頭において脳波の高振幅徐波が多発する傾向が認められ、誘発脳波においても同個体においてわずかな振幅低下と潜時の延長が認められた。今後行動様式の解析を詳細に行うとともに、脳波について詳細な周波数解析を行うことにより、発症初期の異常の抽出を行っていくこととする。リスザルヘスクレイプープリオンを接種した際の潜伏期が 33 ヶ月から 48 ヶ月であり、行動学的異常お

よび、脳波異常所見が認められていることから、継続して経過をおい、発症初期の病態解析を行って行く必要がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 1 7. BSE モデル動物を用いた病理学的解析

分担研究者 高橋 秀宗 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** ウシプリオン発現マウスとプリオンノックアウトマウスを用いて BSE 由来サンプルの病原性を迅速にバイオアッセイできる系を開発し、さらに BSE 病態病理を解析することを目的とした。マウスプリオンノックアウトマウスから神経幹細胞を分離培養しプリオンを培養系で増幅させた後、生体内で分化、生着させることにより病原性の確認を高速化することを期待して実験を進めた。その結果、ノックアウトマウスから神経幹細胞を分離培養することに成功した。また培養神経幹細胞でヒト、ウシ、マウスプリオン蛋白を発現させることも可能になった。スクレイピープリオンと神経幹細胞の培養後、蛋白分解酵素耐性蛋白を調べたところ、スクレイピープリオンは減少したが発現させたプリオン蛋白は増加したため、プリオンが増幅されたと判断した。神経幹細胞の生体内における分化、生着により BSE 病原性の迅速な確認が可能になると予測した。

### A. 研究目的

ウシプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスを用いて BSE サンプルの病原性を早期に診断できる系を開発し、さらに BSE 病態病理を解析する。

### B. 研究方法

マウスプリオンノックアウトマウス由来神経幹細胞を用いて *in vitro* でプリオンの増幅を確認する。

1. マウスプリオンノックアウトマウスの胎児より神経幹細胞を分離培養する。
2. 神経幹細胞でヒト、ウシ、マウスプリオン遺伝子を導入し発現させるためにマウスレトロウイルスベクターを構築する。それぞれモノクロナール抗体 3F4 で認識できるエピトープを含ませる。
3. 神経幹細胞での外来性プリオン蛋白（ヒト、ウシ、マウス）の発現を確認する。
4. プリオンとして、マウススクレイピー脳組織を準備する。
5. 外来性にプリオンを発現させた神経幹細胞とマウススクレイピーサンプルを共培養し継代を行う。
6. 共培養を行う前（0 日）と 7 日後の蛋白分解酵素耐性蛋白を全種のプリオンを検出する B103 抗体、外来性に発現したプリオンを検出する 3F4 抗体を使用してウエスタンブロット法により比較する。

### (倫理面への配慮)

ヒト材料は特に扱っていない。マウスの取り扱いには機関内委員会の承認通り行っている。

### C. 研究結果

1. プリオンノックアウトマウスから神経幹細胞を分離培養し neurosphere を得た（図 1）。
2. プリオンノックアウトマウスより分離した神経幹細胞でマウスレトロウイルスベクターによりモノクロナール抗体 3F4 が認識するエピトープを有するミュータントマウスプリオン（Mouse PrP-3F4）を発現できた（図 2 シェーマ）。
3. 発現をウエスタンブロット（図省略）とプリオン cDNA の後方 IRES から同時に発現される GFP により確認した（図 3 上）。
4. 薬剤セレクションにより外来性プリオン及び GFP 発現細胞を濃縮した（図 3 下）。
5. 蛋白分解酵素耐性蛋白のウエスタンブロット解析により抗体 B103 が検出したマウススクレイピーのプリオン蛋白量は減少しているが、抗体 3F4 が認識する外来性発現蛋白は増加していた（図 4）。
6. 増加した蛋白分解酵素耐性蛋白の感染性については不明。

### D. 考察

プリオンノックアウトマウスから神経幹細胞を分離培養し、3F4 抗体によって認識されるマウスプリオン蛋白を発現させた。マウススクレイピー

一との共培養によりプリオンは減少したが蛋白分解酵素耐性の外来性発現プリオン蛋白は増加したと考えられた。増加した蛋白分解酵素耐性蛋白の感染性を計測すること、神経幹細胞をさらにマウスに戻し、バイオアッセイを行うことにより、BSE 病原体のバイオアッセイの迅速化が検証されると考える。

#### E. 結論

プリオンノックアウトマウス由来神経幹細胞の培養と外来性プリオン蛋白の発現に成功した。さらにマウススクレイピーの共培養により蛋白分解酵素耐性成分を増幅することができバイオアッセイの迅速化を予測させた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 高橋秀宗、佐多徹太郎：クロイツフェルト・ヤコブ病. 朝倉書店、pp.80-82, 2004
- 2) 高橋秀宗、佐多徹太 Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群と亜型、日本臨床 62;Suppl 1: 266-270, 2004.

##### 2. 学会発表

なし。

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

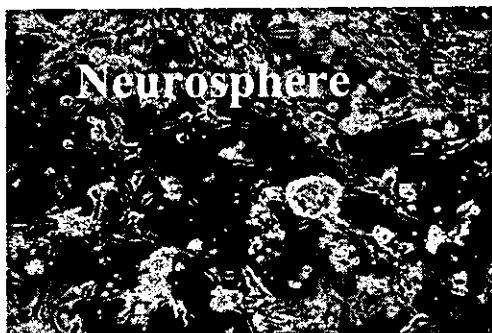


図1 プリオンノックアウトマウスより分離した神経幹細胞による neurosphere。

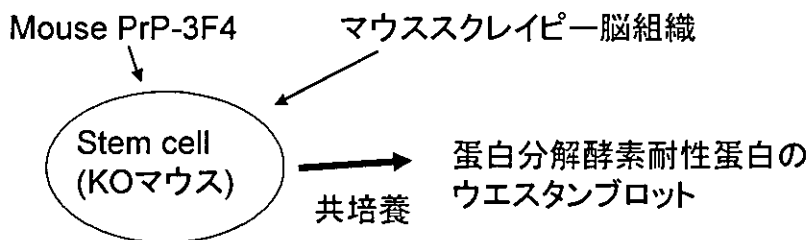


図2 分離神経幹細胞へモノクローナル抗体 3F4 が認識するエピトープを有するプリオン蛋白を発現させ、マウススクレイピー病原体と共培養した。蛋白分解酵素耐性蛋白をウエスタンブロットによって解析した。

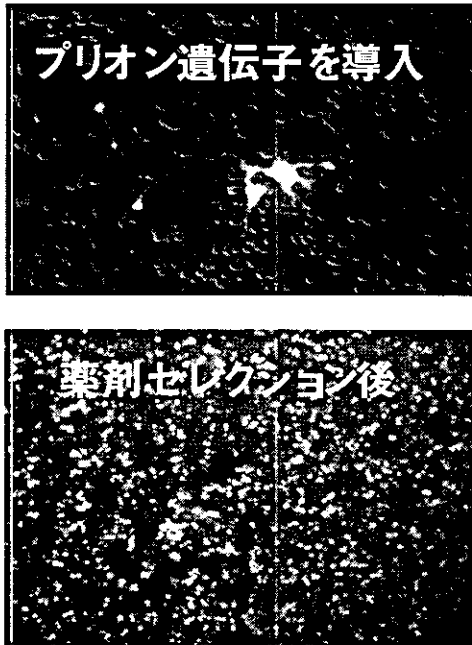


図3 上 マウスプリオンノックアウトマウス由来神経幹細胞での外来性プリオン蛋白の発現。IRES によってプリオンと同時に発現されている GFP を観察している。下 薬剤選択により発現細胞を濃縮した。

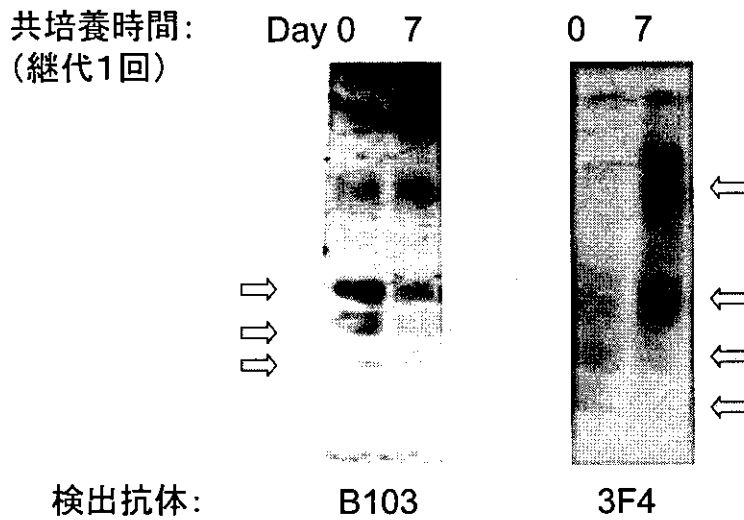


図4 神経幹細胞とマウススクレイピーとの共培養0日後と7日後の蛋白分解酵素耐性蛋白のウエスタンブロット。検出抗体： 左 B103、右 3F4

## 18. 脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するためのとさつ解体処理方法の開発

分担研究者 佐々木 裕之 埼玉県中央食肉衛生検査センター 所長

**研究要旨** 国内で初めて牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来、と畜場においては、BSE の全頭検査、特定部位の除去・焼却等の安全対策が講じられている。一方、とさつ解体時において、脳・脊髄組織が枝肉等に付着し、除去されず流通することが危惧されている。そこで、全国各地の9と畜場で処理された牛枝肉及びブロック肉、さらに一般に流通している市販牛肉について、中枢神経系組織の細胞マーカーであるグリア繊維性酸性タンパク（GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein）の残留を調査したところ、枝肉及びブロック肉から GFAP が検出され、脳・脊髄組織の残留が疑われた。これらの結果と各と畜場の処理工程の調査から、枝肉等に脳・脊髄組織が残留しない処理方法を構築するとともに、安全性確保のための検証法を確立した。

### 研究協力機関及び研究協力者

群馬県中央食肉衛生検査所	鈴木宣夫
群馬県北部食肉衛生検査所	長井 章
千葉県東総食肉衛生検査所	平山勝男
東京都芝浦食肉衛生検査所	鈴木達夫
神奈川県食肉衛生検査所	笠間保一
長野県上田食肉衛生検査所	佐藤彰一郎
宮崎県小林食肉衛生検査所	安田恵江
鹿児島県末吉食肉衛生検査所	特手洋美
国立医薬品食品衛生研究所	松田りえ子

継続して検証する必要があるとした。

そこで本年度は、調査対象施設を増やし、全国各地の9と畜場で処理された牛枝肉の GFAP 残留状況及び施設の作業工程を調査し、枝肉等に脳・脊髄組織が残留しない処理方法を構築するとともに、食肉の安全性を確保するための検証法を確立する。また、カット工場で加工されたブロック肉、切り落とし肉（くず肉）及び一般に流通している市販牛肉について、GFAP 残留量を測定し、牛肉の脳・脊髄組織の残留実態を把握する。

### A. 研究目的

とさつ解体時の脳・脊髄を破壊するスタンニングやピッシングにより、と体の血液や筋肉が脳・脊髄組織に汚染されるか、平成 15、16 年度の本分担研究で調査したが、明確な結果が得られなかった。また、特定の1施設で処理された牛枝肉やブロック肉表面の GFAP 残留状況を調査したところ、その残留が認められた。現在、我が国における一般的な牛のとさつ解体工程では、背割り（枝肉を左右に分割する行為）を行うことにより、脊髄がノコギリにより破砕され、枝肉に付着する。その後、枝肉を洗浄することで、付着した脊髄を除去しているが、調査した施設においては、枝肉の洗浄が不十分であったと結論付けた。さらに、枝肉等の GFAP 残留検査を実施して、と畜場における特定部位の除去の徹底とその作業の確実さを

### B. 研究方法

#### 1. 牛枝肉の GFAP 残留量及び処理工程の調査

と畜場でとさつ解体された牛枝肉について、GFAP 含有量を拭き取り検査により測定した。拭き取り部位は、最後胸椎周囲、第三頸椎周囲、頸部腹側（以上、内側背割り面）及び外側腰部で、骨以外の部分 100 cm<sup>2</sup>とした。採取時期は、洗浄前、洗浄後及び冷却後（-2~0℃ で、21~24 時間冷却、2施設については、3~5 時間冷却）とし、洗浄前・後については、乾いた綿棒で拭き取り、冷却後については、生理食塩水で湿らせた綿棒で拭き取った。各と畜場 20 頭、計 180 頭について実施した。GFAP の測定は、RIDASCREEN Risk Material 10/5（以下キット）を用いた。キットのスタンダード溶液 No.2（脳・脊髄組織 0.1%含有相当）は、GFAP 濃度 3 ng/ml であるため、拭き取り検体

の GFAP 検出限界値は、100 cm<sup>2</sup>あたり 3 ng となる。

処理工程の調査は、拭き取りを実施した 9 と畜場の枝肉洗浄方法について行った。

## 2. ブロック肉、切り落とし肉、市販牛肉の GFAP 残留量

カット工場で加工、包装されたネック部分のブロック肉 44 個（業務用で、1 個 4 kg 前後）について、GFAP 含有量を拭き取り検査により測定した。検査したブロック肉は、表面を 16 から 28 カ所（平均 20 カ所）に分け、すべての面をキット希釈液で湿らせた綿棒により拭き取った。なお、ブロック肉は、枝肉の拭き取り検査を実施したと畜場で処理された枝肉から加工されたものである（一部、拭き取りを実施した枝肉から加工されたものもあった）。

切り落とし肉は、カット工場で、枝肉からブロック肉に加工する際に、産生されるもので、大きさも様々であり、一般に市販されているスライスの切り落とし肉とは、形状が異なる。また、今回調査した切り落とし肉は、2 施設において加工されたもので、挽肉の材料等になる。包装単位で 6 個、計 44.4 kg について、拭き取り検査を実施した。

市販牛肉は、スーパー等で販売しているものを対象とした。スジ、スネ、ヒレ等、計 100 検体について、各検体 2 カ所ずつ拭き取り、検査した。

拭き取りは、キット希釈液で湿らせた綿棒で行い、拭き取り面積は、すべて 100 cm<sup>2</sup>とした。

## 3. 牛脊髄及び末梢神経の GFAP 含有量

牛脊髄（脳に最も近い部分）及び各種末梢神経を、細胞破碎装置を用い乳剤にした後、2 倍段階し、1 g 中の GFAP 量を測定した。脊髄は、16 頭の牛から採取したもの、末梢神経は、11 頭から採取した 14 検体について実施した。

## 4. 牛肉の脳・脊髄組織添加回収実験

洗浄後の枝肉を想定し、霧吹き器で湿らせた牛肉の表面 100 cm<sup>2</sup>に、脊髄乳剤 0.1 ml を添加した。その添加直後あるいは 4°C 24 時間保管後に、綿棒で拭き取り GFAP を測定、回収率を算出した。また、脊髄乳剤添加後、牛肉を水道水で 10 秒間洗浄し、同様に拭き取り GFAP を測定した。

## C. 研究結果

### 1. と畜場における牛枝肉の GFAP 残留状況

洗浄前の枝肉は、胸椎周囲、頸椎周囲、頸部腹側で GFAP 残留量が高く、特に、胸椎周囲と頸椎周囲において、12 ng/100 cm<sup>2</sup>以上の高い値が多かった。枝肉を洗浄することにより、検出限界値以上を呈した数は、洗浄前に比べ 1/6～1/3 に減少した。さらに、冷却することにより、検出限界値以上の検体は、減少したが、完全にはなくならなかった。また、12 ng/100 cm<sup>2</sup>以上の検体は、洗浄により大幅に減少した。外側腹部は、すべて検出限界値未満であった（表 1）。

と畜場別牛枝肉の GFAP 残留状況を表 2 に示す。GFAP 残留度の変化で、いくつかのグループに分類できた。洗浄前に残留度が高く、洗浄後も GFAP が完全に除去されず、数値が高いグループ（A、B、C）。洗浄前に残留度が高いが、洗浄により除去され、洗浄後は、残留を示さないグループ（D、E）。洗浄前でも残留度が低く、洗浄後も低いグループ（F、G）。洗浄前、残留度が低いが、洗浄後も、一部残留している施設（H）。

今回、枝肉の GFAP 残留状況を調査したと畜場の処理方法を表 3 に示す。背割り前に、脊髄吸引を実施していない施設が G と I、背割りを正中線からずらしている施設が G、背割りの時、背割り面に水を流していない施設が A、C、F、I、枝肉の洗浄に自動と手動の両方を使用している施設が A、B、D、手動のみが C、E、F、G、I、自動のみが H であった。

また、1 日の平均処理頭数が 50 頭以上の大規模施設は、B、C、F、H であった。

### 2. ブロック肉、切り落とし肉、市販牛肉の GFAP 残留量

A から I のと畜場で処理した枝肉から加工されたネック部分のブロック肉 44 個（拭き取り検体数計 878）のうち、C と畜場で処理された枝肉から加工されたブロック肉 2 個と I と畜場の 1 個が、GFAP 検出限界値以上を呈した（表 4）。なお、C と畜場の 1 個は、表面 16 カ所拭き取ったうち 8 検体が検出限界値以上を呈し、最高値も 12 ng/100 cm<sup>2</sup>以上であった。

食肉カット工場で加工された切り落とし肉（くず肉）6 個、計 44.4 kg について、GFAP 残留調査



をしたところ、拭き取り 1,006 検体、すべて検出限界値未満であった(表 5)。なお、No.3 以外は、枝肉を調査したと畜場と関連性がない。

市販牛肉については、スネ 50、ヒレ 23、スジ 7、その他 20、計 100 検体、すべて検出限界値未満であった(表 6)。

### 3. 牛脊髄及び末梢神経の GFAP 含有量

牛脊髄中の GFAP 含有量は、27,700~186,800 ng/g であった。末梢神経は、正中神経、肩甲上神経、脛骨神経、坐骨神経について測定したところ、56~1,828 ng/g であった(表 7)。

### 4. 牛肉表面における脊髄の添加回収結果

2 種類の脊髄を用い、濃度を変え牛肉に添加し、直ちに乾燥綿棒で拭き取り GFAP を測定したところ、平均回収率は、 $5.5 \pm 1.6\%$  から  $13.0 \pm 2.0\%$  であった(表 8)。

1 種類の脊髄を用い、濃度を変え添加し、4°C で 24 時間保管後、生理食塩水で湿らせた綿棒で拭き取り GFAP を測定したところ、平均回収率は、 $9.0 \pm 3.9\%$  から  $15.8 \pm 5.7\%$  であった(表 9)。

次に、流水による洗浄効果を調査するため、脊髄添加後、水道水で洗浄し、乾燥綿棒で拭き取り GFAP を測定したところ、すべて検出限界値未満であった(表 10)。

## D. 考 察

と畜場における牛枝肉の GFAP 残留状況から、枝肉を洗浄することにより、GFAP の減少が認められた。また、牛肉を使用した脊髄の添加・水洗実験からも、洗浄の効果は確認された。と畜場別の GFAP 残留状況から、施設により、洗浄の効果に違いがあることが判明した。洗浄後でも GFAP の残留が認められた施設は、背割り時、枝肉背割りに水を流さない、比較的処理頭数が多い等の特徴があった。特に、処理頭数が多い施設で、手動洗浄装置のみの場合(C と畜場)は、長時間に及ぶ作業のため、洗浄が不十分になったと考えられる。

枝肉の洗浄装置で、自動高圧洗浄装置のみ設置の施設(H と畜場)は、背割り前 GFAP の残留が多くはなかったが、洗浄後も残留しており、脊髄周囲の洗浄が十分でなかったと思われた。また、

自動高圧洗浄装置を併用している施設のうち、A と B は、洗浄後も GFAP が残留しており、自動高圧洗浄装置を過信することは危険である。

背割りを正中線からずらしている施設(G と畜場)は、洗浄前においても、ほとんど GFAP が検出されなかったことから、背割りをずらす方法は、枝肉に付着した脊髄を、洗浄により除去する一般的な処理方法に比べ、より安全が確保されると考えられる。

枝肉の GFAP 残留調査において、洗浄後より冷却後の方が、GFAP 残留が少なかったが、枝肉専用冷蔵庫で 1 日保管することにより、表面が乾燥し、堅くなり、拭き取り(検体採取)が十分にできなくなるためと考えられた。今回、B と畜場の冷却後の検体採取が、とさつ解体から 3 時間後で、枝肉表面が完全に乾燥していない状態のため、冷却後の GFAP が高かったことから判断できる。

洗浄後の枝肉(胸椎及び頸椎周囲)から検出した GFAP 量を  $6 \text{ ng}/100 \text{ cm}^2$  (分布が多い)とすると、添加回収実験の結果(平均回収率 8.0%)から、拭き取り部位に存在した GFAP は、 $75 \text{ ng}/100 \text{ cm}^2$  と推定された。また、脊髄中に含まれる GFAP は、27,700~186,800 ng/g であった。これらのことから、拭き取り部位に存在した脊髄組織の量は、 $0.40 \sim 2.71 \text{ mg}/100 \text{ cm}^2$  と推定された。

牛ブロック肉の GFAP 残留状況では、C と I と畜場で処理され、加工されたブロック肉 3 個から GFAP が検出された。C と I と畜場は、洗浄後の枝肉に GFAP が残留していると畜場の 1 つであるため、これがブロック肉に移行していると考えられ、と畜場での汚染防止が重要と思われる。昨年度も、今回と異なると畜場で処理されたネックブロック肉 11 検体中 3 検体から GFAP を検出した。ネック部分は、枝肉の GFAP 残留状況から、脊髄が付着しやすく、除去され難い状態にあると思われる。市販牛肉の検査において、枝肉の時、表面部分だった可能性があるスネ(前肢、後肢の区別は不明)、ヒレ、スジを検査したが、すべて検出限界値未満であり、もともと付着していなかったか、加工の段階で除去されたと思われた。なお、ブロック肉で検査した部位のネックは、一般に市販されていないため、検査できなかった。

今回、末梢神経中の GFAP 量は、脊髄の 15~3,300 分の 1 であったが、脊髄を破碎する背割り後

の枝肉の GFAP 残留量測定には、問題ないと思われる。しかし、市販牛肉の GFAP 測定では、結果に影響を及ぼすか、さらに検討が必要である。

以上のことから、脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するためには、枝肉の背割りを正中線から左右どちらかにずらし、脊髄の付着を最小限にすることが効果的であると思われる。しかし、それが不可能であれば、枝肉に水を流しながら背割りを行い、その後、自動高圧洗浄装置により枝肉全体を洗浄し、さらに手動の高圧洗浄機で脊髄周囲を洗浄、付着した脊髄を除去する。なお、背割り時に水を流すと周囲を広範囲に汚染する可能性があるが、枝肉においては、脊髄の付着力が弱くなり、その後の洗浄が、効率良くなると考えられる。さらに、本分担研究で、過去2年間検討したピッシングについては、その影響を確認するまでに至らなかったが、実施しないことが望まれる。

と畜場においては、特定部位の除去とその作業の確実さを、作業手順書等で点検することになっている。この作業手順書の中で、枝肉の洗浄方法を具体的かつ詳細に定め、その検証方法を記載する必要がある。

今回、GFAP 測定に使用したキットは、8 チャンネルのマイクロピペットと連続分注器、マイクロプレートリーダーがあれば、検査を行うことができる。また、検体の前処理から結果判定まで、20 検体前後で、1 時間以内に終了する。したがって、BSE 結果判定前に、枝肉の GFAP 残留検査を実施し、適正に処理されているか、科学的に検証することが可能である。

本研究において、枝肉の拭き取り部位は、平成 13 年度及び平成 15 年度の厚生労働科学研究事業の結果から、脳・脊髄組織が付着し、残留しやすい部位の最後胸椎周囲、第三頸椎周囲、頸部腹側とした。また、外側腹部については、残留が少ない部位として対象とした。これら各部位について、洗浄前、洗浄後及び冷却後、拭き取りを実施した。しかし、検証作業における拭き取り部位は、洗浄後の胸椎周囲及び頸椎周囲で十分と思われる。

牛を扱うと畜場においては、この検証を1週間の処理頭数に合わせ、検査頭数を定めて定期的に行い、安全性を確保する必要がある。検証した結果、GFAP の残留が認められれば、再度枝肉を洗浄する。また、GFAP 残留が高い施設においては、

原因究明ため、洗浄前の拭き取り検査及び背割り前の脊髄除去率の測定も必要と思われる。

課題としては、GFAP 測定器具が備わった検査施設が、と畜場の近くでない場合、結果判明に時間を要し、再洗浄等の対応が遅れることである。枝肉は、処理後 $-2\sim 0^{\circ}\text{C}$ で急速冷蔵するため、時間が経過すると、表面が乾燥し、洗浄の効果がなくなるとともに、再度洗浄することで、肉の品質に影響を与える恐れがある。そこで、と畜場内あるいはと畜場に隣接するすべての検査施設に、測定器具の設置が望まれる。

## E. 結論

1. 牛を扱うと畜場においては、特定部位の除去とその作業の確実さを、作業手順書等で点検するとともに、洗浄後の枝肉（胸椎及び頸椎周囲）の GFAP 残留検査を実施することにより、脳・脊髄組織が適正に除去されているか、科学的に検証することが可能であった。なお、検証は、処理頭数にあわせ検体数を定め、定期的実施する。
2. と畜場における洗浄後の牛枝肉、カット工場加工された牛ブロック肉から GFAP が検出され、脳・脊髄組織が残留しているものと思われた。市販牛肉は、不検出であった。
3. 脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するためには、枝肉の背割りを正中線から左右どちらかにずらすことが、最も効果的である。それが不可能であれば、枝肉に水を流しながら背割りを行い、その後、自動高圧洗浄装置により枝肉全体を洗浄、さらに手動の高圧洗浄機により脊髄周囲を重点的に洗浄し、背割りにより付着した脊髄を除去する。

## F. 参考文献

- 1) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金分担研究報告書「食肉の神経組織による汚染防止に関する研究」：分担研究者沢谷広志
- 2) 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書「食肉の神経組織による汚染防止に関する研究」：分担研究者沢谷広志
- 3) 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業分担研究報告書「脳・脊髄組織による食肉等の汚染を防止するためのとさつ解体処理方法の開発」：分担研究者佐々木裕之

表 1 と畜場における牛枝肉のGFAP残留状況

拭き取り 部位	採取時期	検体数	100cm <sup>2</sup> あたりのGFAP量 (ng)				
			3未満	3以上 6未満	6以上 9未満	9以上 12未満	12以上
胸椎周囲	洗浄前	160	109	9	8	5	29
	洗浄後	180	172	3	3	1	1
	冷却後	180	177	2	0	0	1
頸椎周囲	洗浄前	160	108	13	10	4	25
	洗浄後	180	163	12	3	0	2
	冷却後	180	177	1	0	0	2
頸部腹側	洗浄前	160	144	9	3	2	2
	洗浄後	180	175	3	1	0	1
	冷却後	180	180	0	0	0	0
外側腹部	洗浄前	30	30	0	0	0	0
	洗浄後	30	30	0	0	0	0
	冷却後	30	30	0	0	0	0

(検査実施と畜場9施設、検査枝肉数計180、GFAPの検出限界値:3ng/100cm<sup>2</sup>)

表 2 と畜場別牛枝肉のGFAP残留状況

と畜場	胸椎周囲			頸椎周囲			頸部腹側		
	洗浄前	洗浄後	冷却後	洗浄前	洗浄後	冷却後	洗浄前	洗浄後	冷却後
A	36	0	1	53	9	0	1	1	0
B	29	1	4	8	4	4	0	4	0
C	37	15	1	28	5	4	6	2	0
D	38	0	0	28	0	0	4	0	0
E	1	0	0	19	0	0	15	0	0
F	10	0	0	0	2	0	2	0	0
G	0	0	0	2	0	0	0	0	0
H	5	0	0	7	6	1	2	0	0
I	-	0	0	-	0	0	-	2	0

注) 表中の数値は、拭き取り検体中に含まれるGFAP量を残留度に換算したもので、20頭分の合計100cm<sup>2</sup>あたりのGFAP量 残留度

残留度	残留度
3未満	0
3以上6未満	1
6以上9未満	2
9以上12未満	3
12以上	4

(検出限界値以上が存在しないと、20検体分の計が0となる)

表 3 各と畜場の処理方法

— 主に洗浄方法について —

と畜場	背割り前の 背髄吸引	背割り 位置	背割り機 の水	高圧洗浄 装置	洗浄時間 (自動)	洗浄時間 (手動)	1日の平均 処理頭数
A	実施	正中線	無	自動・手動	18秒	110秒	50頭未満
B	実施	正中線	有	自動・手動	120秒	120秒	50頭以上
C	実施	正中線	無	手動	—	120秒	50頭以上
D	実施	正中線	有	自動・手動	80秒	30秒	50頭未満
E	実施	正中線	有	手動	—	90秒	50頭未満
F	実施	正中線	無	手動	—	50秒	50頭以上
G	非実施	ずらす	有	手動	—	60秒	50頭未満
H	実施	正中線	有	自動	60秒	—	50頭以上
I	非実施	正中線	無	手動	—	300秒	50頭未満

表 4 国産牛ブロック肉のGFAP残留状況

処理と畜場	検査ブロック肉数	検出限界値 <sup>a)</sup> 以上を呈したブロック肉数
A	5	0
B	5	0
C	5	2
D	5	0
E	5	0
F	4	0
G	5	0
H	5	0
I	5	1
計	44	3

ブロック肉1個につき、表面を16～28(平均20)ヶ所拭き取りGFAPを測定

a) 3ng/100cm<sup>2</sup>

表 5 食肉カット工場から産生される切り落とし肉のGFAP残留状況

切り落とし肉	拭き取り検体数	検出限界値 <sup>a)</sup> 以上を呈した数
No.1 (5.0kg入り)	70	0
No.2 (5.0kg入り)	65	0
No.3 (4.4kg入り)	85	0
No.4 (10.0kg入り)	210	0
No.5 (10.0kg入り)	320	0
No.6 (10.0kg入り)	256	0

(No.3以外は、同一工場加工されたもの)

a) 3ng/100cm<sup>2</sup>

表 6 国産市販牛肉のGFAP残留状況

材 料 <sup>a)</sup>	検体数	検出限界値以上 <sup>b)</sup>
ス ネ	50	0
ヒ レ	23	0
ス ジ	7	0
その他 <sup>c)</sup>	20	0
計	100	0

a) 牛肉1検体につき、2か所(各100cm<sup>2</sup>)拭き取り、GFAPを測定

b) 3ng/100cm<sup>2</sup>

c) カレーあるいはシチュー用(モモ、カタ、バラ等)

表 7 牛脊髄及び末梢神経のGFAP含有量

組 織	GFAP量(ng/g)
脊 髄 (n = 16)	27,700~186,800
正中神経 (n = 6)	116~1,828
肩甲上神経 (n = 1)	254
脛骨神経 (n = 1)	67
坐骨神経 (n = 4)	238~1,142
前腕部の神経 (n = 2)	56~102

表 8 牛肉表面における脊髄の添加回収結果  
 — 脊髄乳剤添加後、直ちに拭き取りにより回収 —

添加材料 <sup>a)</sup>	GFAP		
	添加量(ng)	平均回収量(ng)	平均回収率(%)
40倍脊髄乳剤 0.1ml添加	① 166.8	13.4 ± 3.8	8.0 ± 2.3
	② 151.3	12.1 ± 2.1	8.0 ± 1.4
20倍脊髄乳剤 0.1ml添加	① 333.5	43.2 ± 6.6	13.0 ± 2.0
	② 302.6	16.7 ± 4.7	5.5 ± 1.6
10倍脊髄乳剤 0.1ml添加	① 667.0	79.5 ± 10.4	11.9 ± 1.6
	② 605.1	52.8 ± 11.3	8.7 ± 1.9

a) 添加実験は、各濃度の①及び②を4回ずつ実施  
 ①と②は、別個体由来の脊髄

表 9 牛肉表面における脊髄の添加回収結果  
 — 脊髄乳剤添加後、4°C24時間保存後、拭き取りにより回収 —

添加材料 <sup>a)</sup>	GFAP		
	添加量(ng)	平均回収量(ng)	平均回収率(%)
40倍脊髄乳剤 0.1ml添加	166.8	14.9 ± 6.4	9.0 ± 3.9
20倍脊髄乳剤 0.1ml添加	333.5	34.1 ± 14.7	10.2 ± 4.4
10倍脊髄乳剤 0.1ml添加	667.0	105.6 ± 37.7	15.8 ± 5.7

a) 添加実験は、各濃度4回ずつ実施

表 10 牛肉表面に付着した脊髄組織の流水による洗浄効果

添加材料	GFAP	
	添加量(ng)	洗浄後の平均回収量(ng)
20倍脊髄乳剤 <sup>a)</sup> 0.1ml添加	179.3	0.5 ± 0.1 (すべて検出限界値未満)
10倍脊髄乳剤 <sup>b)</sup> 0.1ml添加	517.2	2.4 ± 0.6 (すべて検出限界値未満)

a) については、2回、b) については、6回実施  
 a)、b) に使用した脊髄は、別個体由来