

1. 総括研究報告書

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究（H29-食品-一般-004）

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究院 教授

研究要旨

英国で発生して世界に拡散した定型 BSE (C-BSE) は、飼料規制等の管理措置により発生は制御下にある。しかし、病型が異なる非定型 BSE (L-および H-BSE) が世界各地で 120 例程度摘発され、依然不安視されている。本研究では、食品を介する非定型 BSE の感染拡大を防ぐための安全対策等に貢献することを目標として、非定型 BSE 感染牛の可食部および特定部位に存在するプリオンの定量化、非定型 BSE のヒトへの感染リスクの推定に資する研究を進め以下の成果を得た： 1) シカ組換えプリオンタンパク質 (PrP) とヒツジ組換え PrP-ARQ を基質として、実用に十分な検出感度を保ちつつ、C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法を確立した。2) ウシ PrP 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより H-BSE プリオンの感染価を測定する用量反応標準曲線を作成した。3) L-BSE 経口投与ザルを投与後 6 年 3 か月経過観察したが発症は確認出来なかったことから、L-BSE のヒトへの経口感染リスクは高くないことが示唆された。4) H-BSE 脳内接種ザルは接種後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は認められていないことから、H-BSE は L-BSE と比較してヒトへの感染リスクが低い可能性が示唆された。5) BSE 感染モルモットの病理学的特徴は、脳幹部神経核を由来とする苔状線維、顆粒細胞、平行線維の系統変性疾患に類似した病態であった。

我が国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する基礎研究として、施設内に衛生検査スタッフが常駐している大規模と畜場および食鳥処理場の協力を得て拭き取り検査を実施した。牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場（牛 2 力所、豚 2 力所、並びに食鳥処理場 2 力所）において枝肉の拭き取り検査を実施し、欧米の HACCP 効果検証法を含めた HACCP 検証プロトコール候補を比較検討した。その結果、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することにより、最も多くの一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群の検出率が最も高かった。豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することにより、最も多くの一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群のみ検出され、「冷蔵前」に「胸」から採取した検体からのみ検出された。これらのデータは HACCP の内部・外部検証システムを構築する際の重要な知見である。また、と畜場・食鳥処理場への HACCP 導入を促進するため、と畜・食鳥処理工程における危害情報を収集した。本年度は、牛、および豚を対象に、処理工程と、危害を減少させる各種薬剤処置を行っている文献について、調査した部位、細菌の種類と数、制御処置前後の菌数の変化情報を一覧に集積した。

研究分担者

新 竜一郎(宮崎大学・医学部・感染症学講座教授)

柴田 宏昭(自治医科大学・先端医療技術開発センター 講師)

安富 康宏(国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センターセンター長)

飛梅 実(国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官)

萩原 健一(国立感染症研究所・細胞生化学部第1室室長)

福田 茂夫(北海道総合研究機構・畜産試験場・基盤研究部・畜産工学グループ 研究主任)

古岡 秀文(帯広畜産大学・畜産学部・基礎獣医学研究部門 准教授)

松浦 裕一(国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 主任研究員)

山崎 剛士(北海道大学・大学院獣医学研究院助教)

鎌田 洋一(甲子園大学・栄養学部フードデザイン学科 教授)

壁谷 英則(日本大学・資源科学部獣医学科准教授)

森田 幸雄(東京家政大学・家政学部 教授)

A. 研究目的

最近、スクレイパーがヒトに伝達する可能性(Cassard et al, 2014)、孤発性 CJD 患者の様々な

末梢組織にプリオンが存在すること(Takatsuki et al, 2016) など、プリオン病の病態の再考を促す知見が集積しているため、プリオン病のリスク管理に資するさらなる知見が必要である。L-BSE は経口ルートでサルに感染するので、食品を介してヒトに感染するリスクがあるが、H-BSE のヒトへの伝達性は明らかでない。また、非定型 BSE のみならず、プリオンが異種動物に伝播する過程で性状が変化してヒトへの感染性を獲得する可能性を含めて、感染リスクを判断する必要がある。

そこで、H-BSE を接種したサルの解析、および BSE プリオン増幅技術による非定型 BSE 感染牛の可食部および特定部位に存在するプリオンの定量化により、感染リスクの推定を行う。また、定量解析に必要な技術の改良と精度管理を行う。さらに、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを推定するため、カニクイザル、ヒト PrP 発現マウスなどを用いた動物実験を行う。これらを通じて、プリオンの感染拡大を防ぐためのリスク管理に貢献する。

と畜場における衛生管理システムを科学的に評価する手法は、既に HACCP を導入している施設における HACCP 効果検証手法としても活用でき、また、国内の HACCP 導入の推進につながる。そこで、欧米のと畜場で導入されている衛生指標菌を用いた HACCP 効果検証手法を参考にしつつ、国内の肉牛、豚、ブロイラーのと畜・解体工程における衛生管理を総合的に評価するための採材ポイント、頻度、および手法を、検体の輸送・保管方法を含めて検討し、国内の施設でも技術・コスト面で実施可能な衛生管理システム評価手法を作成する。と畜処理工程における、サルモネラ属菌などの有害微生物汚染の低減法に関する知見を文献検索等により収集し、必要があれば実証実験を行う。これらを通じて、と畜場・食鳥衛処理場の衛生管理対策の高度化に貢献する。

本研究では、と畜場の衛生管理対策とプリオン病に関する研究を進め、食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理の向上に資する知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

1) 非定型 BSE 感染牛の組織 (可食部および特定部位) のプリオン感染価の測定、ならびに定型 BSE、非定型 BSE 病態の解析

1-1) C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法を確立するために、シカ組換えプリオンタンパク質 (rCerPrP)、ヒツジ組換え PrP (rShPrP-ARQ) など を 基 質 と し て RT-QuIC を 行 っ た。

1-2) H-BSE 実験感染牛の可食部におけるプリオン感染価をウシ PrP 発現 Tg マウスを用いるバイオアッセイにより測定した。

1-3) 各種 BSE 感染牛、BSE および他の動物プリオン病の病態モデルの比較から、脳内 PrP^{Sc} の蓄積の経時的・空間的变化、および体内伝播様式を解析した。

2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

2-1) H-BSE を脳内または経口接種したカニクイザルの経過観察、高次脳機能試験を実施した。定期的に尿、唾液、および脳脊髄液を採材して PrP^{Sc} を調べた。

< と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

1) 食肉処理工程における微生物性危害因子の動態情報収集

と畜場、食鳥処理場への HACCP 導入の際に CCP を設定する際に必要な情報を整理するため、と畜場で処理されるウシおよびブタに関し、各処理行程における微生物性危害因子の分布状況を調査研究した文献情報を収集整理した。

2) と畜場における HACCP システムの妥当性検証に関する実地研修会資料作成

米国、および EU ではその妥当性検証試験が実施されているが、我が国では、各導

入施設が各自の判断で実施しているにとどまる。欧米および我が国の妥当性検証に関する現状と、妥当性検証試験の必要性を周知するための資料を作成した。

3) と畜場での HACCP システムの妥当性を検証する衛生指標菌を用いた試験法開発

ウシ、ブタ、食鳥それぞれのと体の数カ所についてふき取り検査を行い、一般生菌、大腸菌群、大腸菌、腸内細菌科菌群、およびサルモネラの検出と定量を行い、衛生管理システムの評価手法を構築するための科学的根拠を収集した。

(倫理面への配慮)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコール等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱い、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

C. 研究結果

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

1) 非定型 BSE 感染牛の組織 (可食部および特定部位) のプリオン感染価の測定、ならびに定型 BSE、非定型 BSE 病態の解析

1-1) C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法の確立

rCerPrP に加えてヒツジ組換え PrP-ARQ (rShPrP-ARQ) を用いることで、L-BSE と H-BSE を区別可能であることを見出した。H-BSE は rCerPrP でも rShPrP-ARQ でも同様に増幅でき、また終濃度 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下でもその反応は阻害されなかった。一方 L-BSE は rCerPrP を基質とした場合と比

べて、rShPrP-ARQ を基質とした場合 10^1 乗程度反応が低下するが、終濃度 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下では、増幅効率が低下した。また、rShPrP-ARQ を基質として 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下で RT-QuIC 反応により産生されるタンパク質分解酵素抵抗性 PrP (PrP-res) の産生量は、L-BSE で明らかに少なかった。以上の結果から、rCerPrP と rShPrP-ARQ を基質とする RT-QuIC 法により、C-, L-, H-BSE が識別可能となった。

また、確立した RT-QuIC 法を用いて、動物衛生研究部門から分与された、L-BSE 実験感染牛 2 頭、H-BSE 実験感染牛 2 頭の特定危険部位となる各種組織、およびその他の組織の感染価を推定するための RT-QuIC を実施している。

1-2) H-BSE 実験感染牛の可食部におけるプリオン感染価の測定

H-BSE 感染牛 10%脳乳剤の $10^0 \sim 10^{-4}$ 希釈液で、すべてのウシ PrP 過発現マウス (TgBov) が BSE 感染陽性であった (図)。 10^{-5} 希釈液では 5 頭中 1 頭の Tg マウスが感染陽性であり、潜伏期間は 628 日であった。脳内投与後 800 日まで観察したが、 10^{-6} 希釈液では陽性 Tg マウスは確認されなかった。Spearman-Kärber 法により H-BSE 牛脳は 1g 中 $10^{7.4}$ LD₅₀/g の感染価であると算出された。また、H-BSE 牛脳の希釈液に相当する感染価の対数 (Y) ごとの TgBov の潜伏期間 (X) の分布から、用量反応標準曲線の変化ポイントを 10^{-3} 希釈液 ($10^{4.4}$ LD₅₀/g, Y=4.4) での潜伏期間 (平均 329 日, X₀) とした。その結果、H-BSE プリオンの用量反応標準曲線は、 $Y_1 = 19.32 + (-0.046) \times X$ ($1 < X < 329$) ; $Y_2 = 4.4 + (-0.0054) \times X$ ($329 < X < 800$) と算出された (相関係数 $R^2=0.9676$)。

PMCA 法で PrP^{Sc} シード活性陽性の組織を選抜して、TgBov への感染試験を開始した。接種した TgBov は現在経過観察中である。

1-3) 非定型 BSE から C-BSE 様プリオンが出現する可能性の探索

H28 年度までに、L-BSE プリオンを初代伝播 (脳内接種) させたカニクイザルの脳内で、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現する可能性は極めて低いことを示した。本年度は、さらにカニクイザルへ 2 代伝播 (脳内接種) を経た場合に C-BSE プリオンが出現するかという点を、研究班のリソースである 2 代継代ザルの前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種して調べた。C57BL/6J マウスは C-BSE プリオンに感受性/L-BSE プリオンに非感受性であるので、C-BSE プリオンが存在すればマウスは発症する。実験の結果、C-BSE プリオンを 2 代継代したカニクイザルの脳ホモジネートではマウスは 287 ± 10.4 日で人道的エンドポイントに達した (= 陽性コントロール群) が、L-BSE プリオンを 2 代継代したカニクイザルの脳ホモジネートを接種したマウス (= 試験群) は、接種後 360 日を経過した現時点で健康であり、これまで、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが容易に出現することを示唆する結果は得られていない。

1-4) BSE 感染モルモットの特徴的神経病変

脳内接種による BSE 感染モルモット小脳では、クーラーや sCJD-VV2 における小脳病変に類似した小脳皮質の萎縮がみられる。神経伝達物質トランスポーターを指標として形態学的に検討した。PrP^{Sc} が重度に沈着し、顆粒細胞の消失がみられる部位に一致して VGlut1 陽性シナプスの減少・脱落がみられた。脳幹部では、橋小脳路を構成する前庭神経核、橋核の VGlut1 陽性シナプスが減少して

いた。超微形態学的に、顆粒層の軽度病変では苔状線維の脱落、中等度病変では顆粒細胞樹状突起の変性、重度では苔状口ゼットの消失が認められた。BSE 感染モルモット小脳では、PrP^{res} の沈着により顆粒細胞の選択的な傷害が生じ、顆粒細胞の減少・脱落が起こる。次いで、顆粒細胞から伸びる平行線維が減少・脱落し、特徴的な神経変性病変を生じたと考えられる。加えて、橋小脳路に選択的なシナプスの脱落がみられたことから、顆粒層型小脳変性症に類似した系統的変性が起こっていることが示唆された。

2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

2-1) L-BSE 経口投与群の臨床経過および剖検

L-BSE ウシ脳乳剤経口投与ザル（#18、#19）は投与 6 年 3 ヶ月後に安楽死を行った。兩個体とも潜伏期に採取した体液中に PMCA で検出可能な微量の PrP^{Sc} が検出されたが（平成 28 年度報告）安楽死時点までに運動障害や自傷行動以外の異常行動はなく、定期的に撮影したビデオ画像を確認しても、神経・精神症状共に見られず、発症は確認出来なかった。安楽死直後に脳の MRI 撮像を行ったが、発症した個体に見られる脳室拡張を伴う脳萎縮等の異常所見は認められなかった。また、剖検時の解剖所見も脳を中心に特に異常は認められなかった。

病理組織学的検索では、中枢組織では空胞変性などのプリオン病に特徴的な所見は認められず、抗プリオン抗体を用いた免疫組織化学的検索においてもプリオンの明らかな沈着は認められなかった。

2-2) H-BSE 接種群の臨床経過

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種ザル（#24、#25）経口投与ザル（#26、#27）は共に投与後 2 年 4 ヶ月を経過したが、運動障害、異常行動は認められず、神経および精神症状共に見られなかった。引き続き、経過観察中である。

< と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

1) 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の作成

「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料を作成し研修会で活用した（分担研究 8. わが国のと畜場ならびに大規模食鳥処理施設における HACCP システム評価法の検討とと畜場への HACCP 導入を支援する情報収集の報告書を参照）。

2) 牛処理施設の細菌数

2-1) 拭き取り部位の比較

2 施設（B1、B2）で冷蔵前および冷蔵後に、肛門、ともばら、胸から拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。施設 B1 では拭き取り部位間で有意差は認められなかった。一方、施設 B2 では、冷蔵前の肛門で 4.1 cfu/cm²、ともばらで 1.9x10¹ cfu/cm²、胸で 7.5 cfu/cm² で、ともばらは、肛門に比べ、有意に高い値を示した。

一方、冷蔵後では、拭き取り部位間で有意差は認められなかった。

2-2) 採材ポイントの比較

2 施設ともに、一般細菌数は冷蔵前の検体で有意に高い値を示した。

2-3) 施設間の比較

ともばらで一般細菌数が多い傾向が認められたこと、また冷蔵前で一般細菌数が多かったことから、冷蔵前のともばらの検体について一般細菌数が、施設間比較を行ったところ、施設 B1 で 1.3×10^2 cfu/cm²、同 B2 で 1.9×10^1 cfu/cm² となり、施設 B1 の検体で有意に高い値を示した。

2-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

施設 B2 では、何れの糞便汚染指標細菌も検出されなかった。

一方、施設 B1 では冷蔵前の試料で、4 検体 (4.4%) から腸内細菌科菌群が検出された。このうち、1 検体 (1.1% : 肛門) から大腸菌、および大腸菌群が検出された。

Salmonella は全ての検体で陰性であった。

3) 豚処理施設の細菌数

3-1) 拭き取り部位の比較

2 施設 (S1、S2) で冷蔵前および冷蔵後に、肛門、胸、頸から拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、冷蔵前の検体において、施設 S1 で採取した検体の中央値は、肛門で 4.3 cfu/cm²、胸で 4.5×10^1 cfu/cm²、頸で 4.3×10^1 cfu/cm² で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意に高い値を示した。一方、施設 S2 では、部位間で有意差は認められなかった。

3-2) 採材ポイントの比較

施設 S1 で採取された検体の中央値は、

冷蔵前後で、採材ポイント間で有意差は認められなかった。一方、施設 S2 では、冷蔵前で 1.3×10 cfu/cm²、冷蔵後で検出限界未満となり、冷蔵前の検体で有意に高い値を示した。

3-3) 施設間の比較

冷蔵前後、および部位別ともに、施設間で一般細菌数に有意差は認められなかった。

3-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

施設 S1 で 1 検体 (1.1%)、および施設 S2 で 2 検体採取されたもののうち、それぞれ 1 および 2 検体 (3.3%) から腸内細菌科菌群が検出された。これらは冷蔵前に採取された胸であった。

また、大腸菌、大腸菌群、ならびに *Salmonella* は陰性であった。

4) 鶏処理施設の細菌数

4-1) 拭き取り部位の検討

施設 C2 で処理された 10 羽の鶏について、3 カ所 (胸、腹、モモ) から採材し、一般細菌数を比較した。その結果、中央値が、胸で 4.9×10^3 cfu/cm²、腹で 5.6×10^3 cfu/cm²、モモで 5.3×10^3 cfu/cm² と大きな差は認められなかった。

4-2) 拭き取り部位の比較

2 施設 (C1、C2) でチラー後に、胸、モモからそれぞれ拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、施設 C1 では拭き取り部位間で有意差は認められなかったが、施設 C2 では、胸で 3.7×10^1 cfu/cm²、モモで 5.3×10^1 cfu/cm² で、モモは胸に比べ、有意に高い値を示した。

4-3) 施設間の比較

2 施設間で、胸、モモの一般細菌数を比較した。その結果、施設 C1 で採取した検体の中央値は、 1.9×10^1 cfu/cm²、同 C2 で 4.4×10^1 cfu/cm² で、施設 C2 は、同 C1 に比べ、有意に高い値を示した。

4-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

腸内細菌科菌群は、施設 C1 で 16 検体 (53.3%)、C2 で 20 検体 (66.6%) から検出された。

このうち、大腸菌群と大腸菌が検出されたものは、施設 C1 で 3 検体 (10.0%)、同 C2 で 1 検体 (3.3%) であった。

一方、*Salmonella* は施設 C2 の 1 検体 (3.3%) からのみ検出された。

D. 考察

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

- 1) 非定型 BSE 感染牛の組織 (可食部および特定部位) のプリオン感染価の測定、ならびに定型 BSE、非定型 BSE 病態の解析

rCerPrP を基質に用いて、RT-QuIC の反応系に非感染牛脳乳剤を添加することで、C-BSE の異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の増幅は完全に阻害されるが、L-/H-BSE の PrP^{Sc} の増幅は阻害されないことから rCerPrP を用いる RT-QuIC で C-BSE と L-/H-BSE は明確に区別可能となった。(平成 28 年度成果)。しかし、L-/H-BSE を区別することができなかった。

本年度、基質として rShPrP-ARQ を用いたところ、H-BSE の PrP^{Sc} の増幅は阻害されないが、L-BSE の PrP^{Sc} の増幅が完全ではないものの阻害されることを見出した。また、増幅産物中の PrP-res 量が、増幅が阻害されない H-BSE で多く、部分的に増幅が阻害される L-BSE で少ないという傾向を見出した。これらを組み合わせることで、高濃度脳乳剤存在下でも PrP^{Sc} を検出可能であり、かつ

C-、L-、H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法の実施が可能となった。

H-BSE 感染牛 (発症期) の脳に分布するプリオン感染価 $10^{7.4}$ LD₅₀/g は、C-BSE ($10^{6.6}$ LD₅₀/g) や L-BSE ($10^{6.9}$ LD₅₀/g) の感染牛と同レベルであると考えられる。また、用量反応標準曲線を用いることで、H-BSE 感染牛の組織に分布するプリオン感染価を脳と比べて 1/100、000 まで測定可能であると考えられた。

また本年度は、カニクイザルの脳内で L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現・増殖する可能性について調べた。C57BL/6J マウスを用いたバイオアッセイの結果から、L-BSE プリオンがカニクイザルへ 2 代伝播しても C-BSE プリオンが出現する可能性は低いと考えられた。

BSE 感染モルモットの小脳医病変は特徴的な所見を呈した。顆粒層および分子層、さらには脳幹部各神経核における VGlut1 陽性シナプスの減少・消失は、PrP^{res} の沈着による苔状線維 顆粒細胞間シナプスの減少あるいは消失を示唆し、顆粒細胞神経突起である平行線維シナプス減少・消失に至ったものと考えられた。小脳失調型 CJD においても顆粒細胞の減少がみられ、苔状線維 顆粒細胞間シナプスにおける PrP^{Sc} 沈着によって顆粒細胞が消失した結果、顆粒細胞から伸びる平行線維が消失することが病変形成に関与することが報告されている。

苔状線維は橋核に由来するが、その橋核において、VGlut1 陽性シナプスの減少がみられた。一方、小脳核、オリブ核の VGlut2 陽性シナプスの発現に変化はみられなかった。大脳皮質からの情報は、大脳皮質-橋-小脳系を通じて小脳皮質に伝えられる。このうち、橋小脳路に選択的なシナプスの脱落がみられたことから、系統的変性が起

こっていることが示唆され、顆粒層における変化と合わせると、顆粒層型小脳変性症に類似した病態であると考えられた。

2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

L-BSE 経口投与については、Mestre-Francé らのグループが、カニクイザルなどの真猿類より下等な原猿類であるハイロネズミキツネザルでの伝播を報告したが、ヒトに近い真猿類での論文報告はまだない。今回のカニクイザルへの経口投与による L-BSE 感染実験 (#18、#19) では、6 年 3 ヶ月経過観察をしたが、発症に伴う異常行動、運動障害や神経・精神症状は見られず、剖検所見も異常はなかった。また、剖検直後の脳 MRI 撮像も特に異常所見は認められなかったことから少なくとも 6 年の期間では発症は認められなかった。

しかしながら、剖検時の各組織中の PrP^{Sc} の測定をまだ行っていないが、昨年度の報告で、定期的に採材した体液類から一時的に連続 PMCA 法で PrP^{Sc} が検出され、特に #19 は投与後 4.5、4.8、5.0 年に採取した CSF から連続して検出されたので、L-BSE は経口により感染はするが、C-BSE に比べ発症するまでの期間が長い可能性も考えられた。

H-BSE 経口投与または脳内接種したサルは共に投与後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は見られていない。ウシへの脳内接種実験の場合、L-BSE と H-BSE の潜伏・発症期間に大きな差は無いと報告されているが、我々が先に行った L-BSE 脳内接種したサルは 1.6~1.7 年目に発症していたので、サルでは H-BSE は L-BSE に比べ少なくとも伝播しにくい事が示唆されるが、引き続き、経過観察を行っていく。

< 畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

1) 牛処理施設での衛生指標菌検査のための採材部位および採材ポイント

採材部位の検討において、本研究で対象とした、と畜場施設のうち、施設 B2 では、ともばらは肛門に比べて有意に多くの菌数が検出されることが明らかとなった。採材ポイントの検討では、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

本研究では *Salmonella* が全く検出されなかったことから、本研究で対象とした施設では、同菌による牛肉の汚染は非常に少ないものと考えられた。

施設 B1 は B2 に比べ、多くの一般細菌が検出された。さらには、腸内細菌科菌群、および大腸菌群、大腸菌の検出された検体は何れも施設 B1 であった。施設 B2 は対米国・EU 等牛肉輸出認定施設であり、施設 B2 で導入している HACCP システムは毎月、厚生労働省の査察を受けている。また、施設 B2 はゼロトレランスを実施している。これらのことから、施設 B2 では、より衛生度が高く評価された可能性が考えられた。

2) 豚処理施設での衛生指標菌検査のための採材部位および採材ポイント

施設 S1 では、胸、および頸からは、肛門に比べて有意に多くの一般細菌数が検出され、また、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

施設 S1 および S2 は、いずれも世界食品安全イニシアチブ (GFSI) に所属する同じ HACCP 認証を取得している。施設 S1、ならびに同 S2 で採材された検体を比較したところ、両施設間で一般細菌数に有意差は認められなかった。さらには、腸内細菌科菌群の検出頻度にも差が認められなかった。以上のことから、両施設で処理された豚枝肉の衛生状況は同程度であると考えられた。

3) 鶏処理施設での衛生指標菌検査のための採材部位および採材ポイント

採材部位の検討において、胸、腹、モモについて 10 羽からの拭き取り検体について検討したところ、何れの間にも有意差は認められなかった。これは、採材のタイミングが、チラー洗浄直後であることから、チラー水により鶏と体のほぼ全域が浸漬されるため、何れの部位においても同程度の細菌汚染をしているものと考えられた。そこで本研究では、実際の作業実施上より簡便な作業となる「胸」、および「モモ」を拭き取り部位として設定した。

この条件にて、施設 C1、ならびに C2 で採材された検体を比較したところ、モモでは、施設 C2 は C1 に比べて多くの一般細菌数が検出された。施設 C1、C2 ともに大規模食鳥処理施設であり、同じ内臓摘出装置を使用しているが、その他の処理工程は若干異なっている。これらの処理工程の違いが一般細菌数の差にあらわれたのかもしれない。

一方、糞便汚染細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）については、牛や豚に比べ、効率に検出されたが、腸内細菌科菌群が最も高い割合で検出された。また、大腸菌群、大腸菌、ならびに *Salmonella* が検出された検体は、何れも腸内細菌科菌群が検出されたことから、最も感度良く、糞便汚染の指標となるものとして、腸内細菌科菌群が適当であると考えられた。

牛や豚は 1 頭ごとに使用器具等が消毒され個体で処理されるが、鶏の処理工程は連続で処理されている。本報告だけでなく、多くの国々の報告においても、鶏のふき取り検体は牛や豚のふき取り検体に比べ一般細菌、大腸菌群数、大腸菌等の検出割合は高率に、検出菌数は高値を示している。これは、鶏のふき取り検体の特徴であると思われる。

本研究では、HACCP システムの検証を目

的としているため、対象施設における一連の作業工程の衛生管理を評価するために、「最も感度良く」一般細菌、ならびに糞便汚染指標細菌を検出することを指標として、各条件を設定した。このような指標で設定された評価方法により評価された成績は、実際に流通する枝肉の衛生状態を必ずしも反映していないことに留意する必要がある。実際に本研究でも、一般細菌数は、冷蔵前に比べ冷蔵後で少なく、また、一連の糞便汚染指標細菌等においても、牛や豚では冷蔵前からのみ検出された。以上のことから、本研究で検討した方法による成績と、市場で流通する枝肉の状態が乖離している可能性がある。実際に米国では、衛生指標細菌として、大腸菌を採用している。今後、確立する HACCP システム検証方法の目的を明確に設定し、対象とする施設事業者や一般消費者等にも啓蒙する必要がある。

E. 結論

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

- 1) rCerPrP と rShPrP-ARQ を基質として、かつ非感染牛脳乳剤の存在/非存在下で RT-QuIC を行うことで、野外材料の検査として、実用的に十分な検出感度を保ちつつ、C-, L-, H-BSE を識別することが可能となった。
- 2) H-BSE 感染牛（発症期）の脳には、TgBov に対して $10^{7.4}$ LD₅₀/g の感染価があることを明らかにし、H-BSE プリオンの感染価を測定する用量反応標準曲線を樹立した。
- 3) L-BSE 経口投与ザルを 6 年 3 か月経過観察したが、発症は確認出来なかった。L-BSE のヒトへの経口感染リスクは C-BSE と比較して高くないことが示唆された。
- 4) H-BSE 脳内接種ザルは接種後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は認められていない。

L-BSE と比較して、H-BSE は霊長類へ伝播はしにくい可能性が示唆された。

- 5) BSE 感染モルモットの病理学的特徴は、脳幹部神経核を由来とする苔状線維、顆粒細胞、平行線維の系統変性疾患に類似した病態であった。

< と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

今年度は施設内に衛生検査スタッフが常駐した大規模と畜場および食鳥処理場の協力を得て拭き取り検査を実施した。

牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することにより、最も高率に一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群が最も検出率が高く、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」の検体からのみ検出された。

豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することにより、最も高率に一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群のみ検出され、「冷蔵前」に「胸」から採取した検体からのみ検出された。

鶏では、採材部位間で一般細菌数に有意差は認められなかった。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群が最も高率に検出された。また、

一般細菌数と腸内細菌科菌群数の間に弱い相関性が認められた。

と畜場に HACCP を導入する際に有効な文献情報を収集整理した。牛および豚と体の処理工程別に文献を整理した。各行程について、汚染細菌種およびその汚染菌数、実施した処理の前後の菌数の変動が読み取り易い一覧表を作成した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
各研究分担者の報告書を参照
2. 学会発表
各研究分担者の報告書を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし