

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. C-, L-, H-BSE 鑑別・高感度検出用 RT-QuIC 法の確立

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学・大学院獣医学研究科)

研究協力者 岩丸 祥文 (農研機構・動物衛生部門)

研究要旨

定型 BSE (C-BSE) および非定型 BSE (L-BSE および H-BSE) のモニタリングに使用可能な実用的な Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法として、平成 28 年度、シカ組換え PrP (rCerPrP) を基質として非感染脳乳剤存在下で RT-QuIC を行うことで、検出感度を損なうことなく C-BSE と L-BSE を明瞭に区別できることを見出した。しかし、この方法では H-BSE と L-BSE の非定型 BSE を識別できなかった。本年度は、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。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 10^2 乗程度反応が低下するが、H-BSE は反応が低下しなかった。また、rShPrP-ARQ を基質とした T-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、H-BSE で明らかに多かった。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。

A. 研究目的

英国で発生して世界各地に広がった BSE (定型 BSE, C-BSE) は、飼料規制などの管理措置が有効に機能して、現在その発生は制御下にある。しかし、定型 BSE とは性質が異なる BSE (非定型 BSE) が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。非定型 BSE は、主に PrP^{Sc} の分子性状から L 型 (L-BSE)、H 型 (H-BSE) に分類され、これまでに 120 例が確認されている。

Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法は、簡便かつ高感度に PrP^{Sc} を検出可能な方法である [1, 2]。実際に、スクリーニングで使用されている ELISA よりも 1000 倍以上高い感度で PrP^{Sc} を検出でき、バイオアッセイを上回る感度が得られる。しかし、RT-QuIC 反応は夾雑物に影響を受けやすく、高濃度の組織乳剤により反応が阻害されるという欠点があったが、シカ PrP (rCerPrP) を基質として RT-QuIC 法を行うことで、被検脳乳剤が最高濃度でも C-BSE および L-BSE が検出可能であることを報告した (平成 27 年度)。さらに、rCerPrP を基質として非感染脳乳剤存在下で RT-QuIC を行うことで、検出感度を損なうこと

なく C-BSE と L-BSE を明瞭に区別できることを報告した (平成 28 年度)。しかし、L-BSE と H-BSE を識別する RT-QuIC 法の確立には至らなかった。2016 年に舂甚らは、組換え Bank Vole PrP (rBVPrP) とヒツジ PrP-ARR (rSfPrP-ARR) を用いることで、RT-QuIC 法により、C-, L-, H-BSE を区別可能であることを報告した [3]。この方法は増殖効率の差で 3 種の BSE を区別するので、識別精度の視点で改良の余地があると考えられた。そこで、本研究では、より実用的で、かつ C-, L-, H-BSE を識別できる RT-QuIC 法の確立を行った。

B. 研究方法

1) 組換え PrP (rPrP) タンパク質の精製と RT-QuIC 法

rPrP は平成 27 年度および 28 年度と同様の方法で実施した。rCerPrP に加えて rShPrP-ARQ を使用した。プレートリーダーとして TECAN F200 を用いた。プレートは 96 well optical bottom plate (Thermo Fisher) を使用し、下方測定により蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 500 mM NaCl, 100 μ M EDTA, 10 μ M ThT を基本とし、必要に応じて、NaCl

および rPrP の濃度、pH および SDS 濃度を変更した。また攪拌スピードは 432 -218 rpm の範囲で変化させた。

プリオン感染脳材料として、L-BSE (JP24) および C-BSE (JP2) の脳乳剤を用いた。また、H-BSE 感染牛の脳乳剤は農研機構・動物衛生研究部門から分与を受けた。陰性対照として、BSE 非感染牛脳を用いた。

2) PrP-res の検出

RT-QuIC 反応の産物を PK 処理し、定法に従いウエスタンブロット (WB) により PrP-res を検出した。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている (実験番号 2017-1-14)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会で承認された動物実験計画書(実験番号 13058, 13059)に従って実施した。

C. 研究結果

1) rCerPrP と rShPrP-ARQ を用いた H-BSE の増幅 (図 1)。

H-BSE の脳乳剤の十倍段階希釈例 10^{-3} (反応系に添加できる脳乳剤の最大濃度) $\sim 10^{-9}$ を rCerPrP を基質として RT-QuIC を行った場合、 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ まで、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の増幅が陽性となり、この反応液中に終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えても、反応は阻害されることなく、若干検出感度が上昇し、 10^{-9} まで陽性となった。rShPrP-ARQ を基質として H-BSE の増幅を行った場合、rCerPrP の場合と同様に 10^{-8} まで陽性となり、この反応は終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤添加によっても阻害されなかった。

2) rCerPrP と rShPrP-ARQ を用いた L-BSE の増幅 (図 2)。

L-BSE の脳乳剤の十倍段階希釈例 10^{-3} ($\sim 10^{-9}$ を rCerPrP を基質として RT-QuIC を行った場合、 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ まで PrP^{Sc} の増幅が陽性となり、この反応系に、終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えると、L-BSE の検出限界は 10^{-9} と 1 段階上昇した。従って、rCerPrP を用いた RT-QuIC は、L-BSE と H-BSE を区別できなかった。rShPrP-ARQ

を基質として用いた場合、検出限界は 10^{-7} までと 1 段階低下したが、実用レベルの検出感度を有しているとかんがえられ他。この反応系に、終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えた場合、反応が阻害され検出限界が 10^{-6} に低下した。C-BSE を rCerPrP で検出する RT-QuIC では、終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤の添加により、RT-QuIC は完全に阻害される (平成 28 年度報告)。このような完全阻害には至らないものの、rCerPrP を基質として終濃度 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下で RT-QuIC を実施した場合に比べて、2 Log の反応低下が生じることから、rCerPrP と rShPrP-ARQ の使用により、L-BSE と H-BSE を識別可能な RT-QuIC が実施できると考えられた。

3) PrP-res の相違

rShPrP-ARQ を基質とする RT-QuIC により L-BSE と H-BSE を識別可能と考えられたが、C-BSE を rCerPrP で検出する RT-QuIC の場合のような、終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤の添加による、反応の完全な阻害という、明瞭な差異ではないことから、異なる指標による補強が必要と考えられた。そこで、RT-QuIC 産物中の PrP-res を WB により調べた (図 3)。

L-BSE および H-BSE ともに増副産物の蛍光強度が同定度の試料を使用した。rShPrP-ARQ を基質として、終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤存在下で実施した RT-QuIC 産物中の PrP-res 量は、チオフラビンの蛍光強度が同定度であるにもかかわらず、L-BSE で少なく H-BSE で多かった。

この違いは、rShPrP-ARQ を用いた RT-QuIC で認められた L-BSE と H-BSE の反応性の違いを補強する違いとして利用可能と考えられる。

D. 考察

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。RT-QuIC は夾雑物の存在により反応が阻害されやすいという欠点を有するが、rCerPrP を用いることで、反応系に添加できる最大濃度の脳乳剤存在下でも微量の PrP^{Sc} を検出可能であった (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 (図 4)。

E. 結論

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。

<引用論文>

1. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med.* 17(2): 175-178, 2011. doi: 10.1038/nm.2294.
2. Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* 6(12): e1001217, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1001217
3. Masujin K, Orrú CD, Miyazawa K, Groveman BR, Raymond LD, Hughson AG, Caughey B. Detection of Atypical H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy and Discrimination of Bovine Prion Strains by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol.* 54(3): 676-686, 2016. doi: 10.1128/JCM.02731-15

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. *J. Gen. Virol.*, 98: 2615-2627, 2017. Doi: 10.1099/jgv.0.0.000907
- 2) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Flow Cytometric Detection of PrP^{Sc} in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains. *J. Virol.*, 92 (1): e011457-17, 2017. Doi: 10.1128/IJV.01457-17

2. 学会発表

- 1) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Unique reactivity of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CWD by RT-QuIC. Prion2017 (May 23-26, 2017, Assembly house, Edinburgh, UK)
- 2) Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. Prion2017 (May 23-26, 2017, Assembly house, Edinburgh, UK)
- 3) Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Analyses of neuron-autonomous mechanisms for neurodegeneration in prion diseases on neuron-enriched primary cell cultures. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)
- 4) Yamasaki T, Iwamaru Y, Matsuura Y, Kuroda M, Hasebe R, Okada H, and Horiuchi M. Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical

BSEs. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

Korea)

5) Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

6) Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. Joint Symposium between Seoul National University-Hokkaido University “Infection and Immunity” (Nov 15, 2017, Seoul National University, Seoul,

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

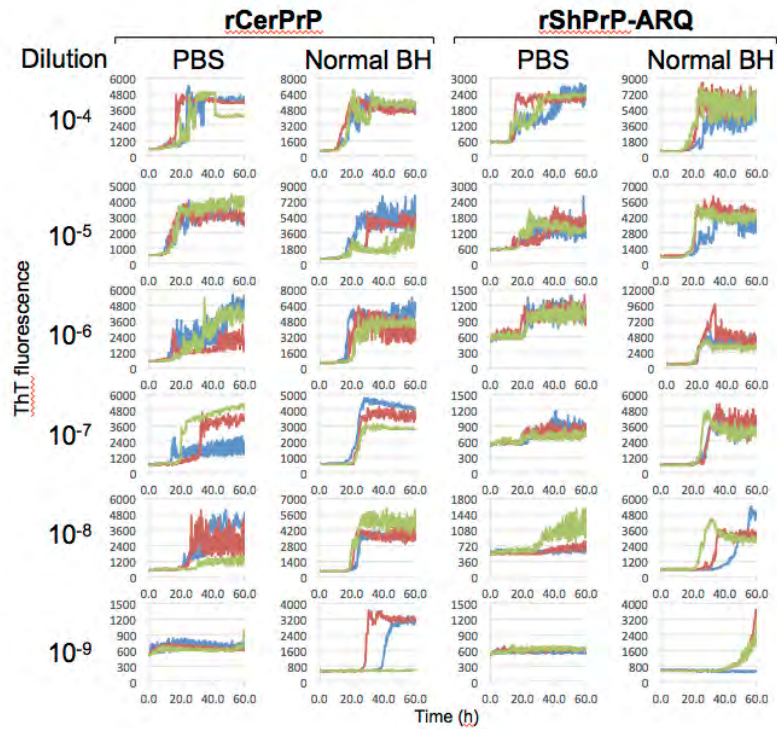


図1 rCerPrP (左) およびお rShPrP-ARQ (右) を基質とした RT-QuIC による H-BSE の検出。Normal BH は終濃度 0.1%非感染牛脳乳剤存在下での RT-QuIC の結果を示す。

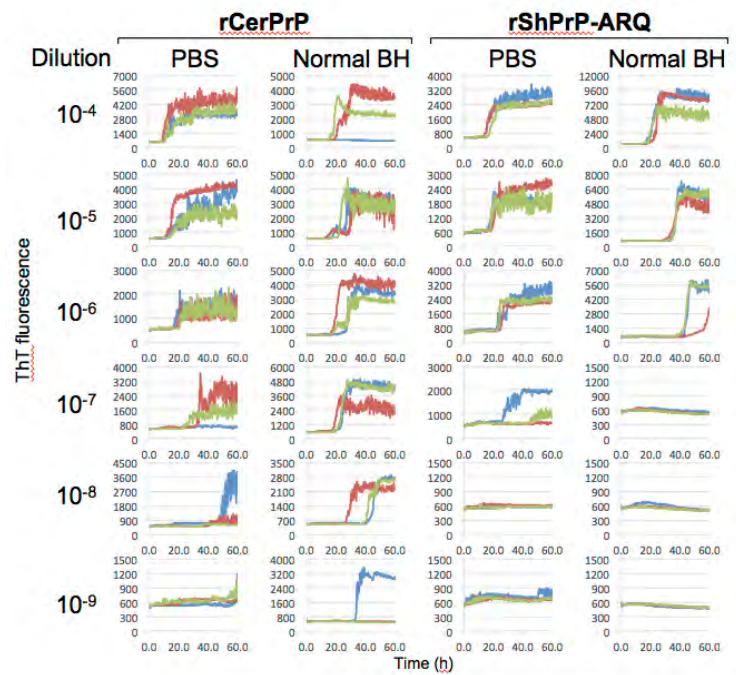


図2 rCerPrP (左) およびお rShPrP-ARQ (右) を基質とした RT-QuIC による L-BSE の検出。Normal BH は終濃度 0.1%非感染牛脳乳剤存在下での RT-QuIC の結果を示す。

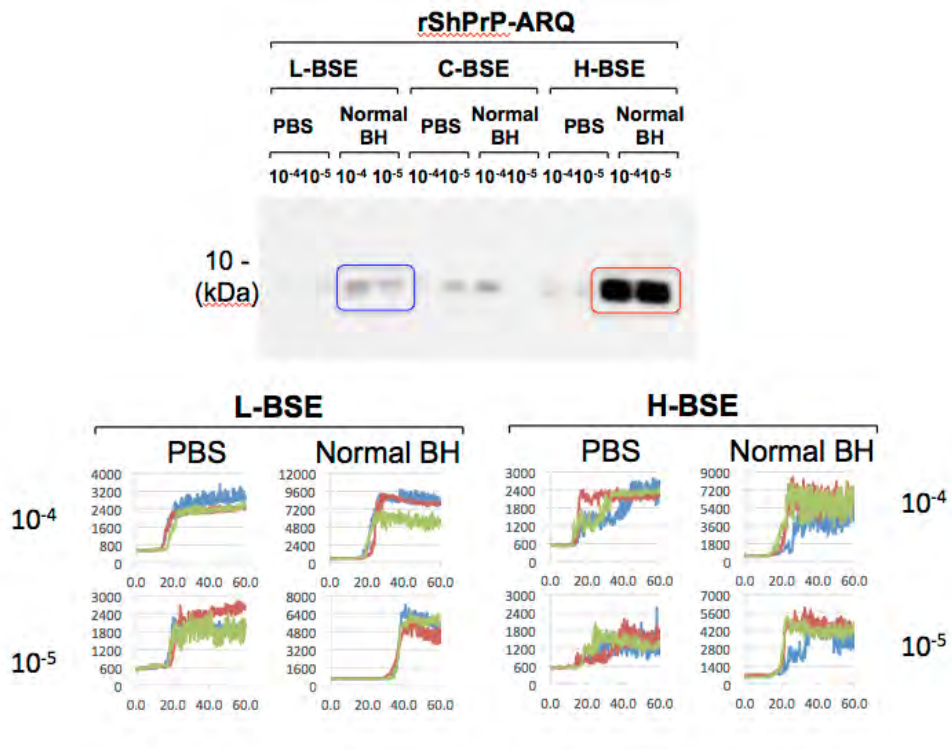


図3 L-BSE および H-BSE の RT-QuIC 増幅産物中に含まれる PrP-res
 それぞれ、非定型 BSE 感染牛脳乳剤の 10^{-4} 、 10^{-5} 希釈から増幅された試料中の PrP-res を示す。

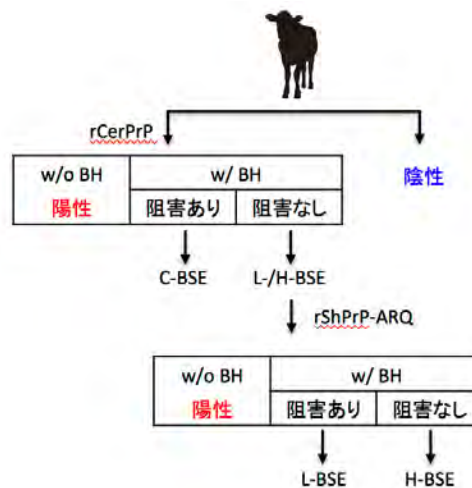


図4 RT-QuIC による C-/L-/H-BSE の識別。w/o BH:非感染脳乳剤非存在下、w/ BH:非感染脳乳剤存在下

2. ケミカルバイオロジーによる抗プリオン化合物の作用機序の解析

分担研究者 新 竜一郎 宮崎大学・医学部 教授

研究協力者 高月 英恵 (宮崎大学・医学部・感染症学講座)

研究協力者 宮崎 幸子 (長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科)

研究要旨

本研究では、プリオン病予防・治療薬開発を目的として、ドラッグ・リポジショニングの観点から Surface Plasmon Resonance imaging 法を応用し、アメリカ食品医薬品局(FDA) 承認済みの 1200 の薬剤から Prion protein (PrP)に結合する化合物をスクリーニングにより同定した。それら 30 の化合物のうち、さらにプリオン感染培養細胞において異常型 PrP (PrP^{Sc}) 生成抑制効果を持つ 3 種の化合物 (Alprenolol、Collistin、Bisoprolol) を見出した。3 種の中で最も抑制効果が高く、血液脳関門を通過しやすい Alprenolol を Fukuoka-1 株感染マウスに自由飲水にて投与したところ、プリオン感染 115 日の段階では PrP^{Sc} の減少が観察されたが、最終的な生存期間の延長はもたらさなかった。一方、Docking simulation では、Alprenolol は PrP のホットスポットと呼ばれる Helix B 近傍の領域に結合することが示唆された。

A. 研究目的

プリオン病では、正常型 PrP(PrP^C)と異常型 PrP(PrP^{Sc})が結合し、PrP^C が PrP^{Sc} に連続的に構造変換することで PrP^{Sc} が脳内に蓄積することで発症すると考えられている。これまでプリオン感染培養細胞レベルで見いだされた PrP^{Sc} を減少させる作用を有するいくつかの化合物が治療薬の候補として試されてきたが、臨床レベルで有効性が認定させた予防・治療薬は開発されていない。

近年、これまで医薬品として使用され、安全性に関する情報も豊富である既存の薬剤から新たな作用を見出し、これまでと異なる疾患の治療薬として用いる、「ドラッグ・リポジショニング」の重要性が提唱されている。既存薬剤は、ヒトにおける体内動態が確認されており、開発コストも大幅に抑えられることから、特にプリオン病のような希少疾患の治療薬開発の手法として注目されている。本研究ではこの観点からアメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済みの 1200 の薬剤について Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法を用いて抗プリオン作用を持つ薬剤のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

1) Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法

による第一スクリーニング

SPRi 法は金属薄膜センサー周辺の濃度変化を表面プラズモン共鳴の原理により、リアルタイムに分子間相互作用を鋭敏にとらえることができ、リガンド (センサーに結合させた分子) とアナライト (流路に流す分子) との解離定数 (K_D : dissociation constant [単位は M]) を測定可能な系である。本研究ではリガンドとして FDA 承認済みの医薬品ライブラリー1200 種類、アナライトとしてヒト配列 recombinant PrP₉₀₋₂₃₁(recHuPrP)を用いた。

2) Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞による第二スクリーニング

第一スクリーニングにより解離定数 10^{-7} M 以下の recHuPrP に高い結合性を示した 30 の化合物について、第二スクリーニングとして Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞にそれぞれ $\sim 100\mu\text{M}$ まで投与し、PrP^{Sc} 生成抑制作用を示すかどうか Western blotting により測定し検討した。

3) Fukuoka-1 株感染マウス実験による in vivo での抗プリオン作用の検証

第二スクリーニングで PrP^{Sc} 生成抑制作用を示した 3 種の化合物のうち、最も効果が高く、血液脳関門の透過性も高いことが知られていた

Alprenolol について、その *in vivo* における効果を検証した。4 週齢の CD-1 マウスに 10%(w/v)の Fukuoka-1 株発症マウス brain homogenate を 20 μ l を脳内接種し、翌日より Alprenolol (250 mg/あるいは 50 mg/L) の自由飲水による投与を開始した。プリオン接種後 115 日 (115 d.p.i) と発病末期にマウスを解剖し、脳組織を採取した。

4) Docking simulation

AutoDock と呼ばれる分子モデリングシミュレーションソフトウェアを用いて、Alprenolol とマウス配列 PrP 間の Docking simulation を行った。

(倫理面への配慮)

本研究課題において、動物実験は長崎大学動物実験委員会に申請し、承認を得て実施した。プリオンに感染している試料を用いるのに対し、すべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等ないよう細心の注意を払って行った。

C. 研究結果

1) Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法による第一スクリーニングにより、recHuPrP に解離定数 10^{-7} M 以下で結合する 30 種の化合物を見出した。

2) 次に第二スクリーニングとして、30 の化合物の Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞に対する PrP^{Sc} 生成抑制効果を Western Blotting にて測定した。その結果、3 種の化合物 (Alprenolol, Collistin, Bisoprolol: 図 1 参照) が 100 μ M までの濃度で抑制効果を示した (図 2 参照)。中でも Alprenolol が最も低い濃度で抑制効果を示すことが判明した。

3) 次に Alprenolol について Fukuoka-1 株感染マウス実験による *in vivo* での抗プリオン作用の検証を行った。115d.p.i では PrP^{Sc} の減少が観察され (図 3 参照)、さらに 50 mg/L 投与群の脳領域での空胞変性が有意に低下していた (図 4 参照)。しかし最終的な生存期間の延長はもたらさなかった (図 5 参照)。一方、Docking simulation では、Alprenolol は PrP のホットスポットと呼ばれる Helix B 近傍の領域に結合することが示唆された。

D. 考察

本研究では、recHuPrP への結合性を指標として、アメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済みの 1200 の薬剤から 30 の化合物を絞り込み、プリオン感染培養細胞 (Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞) にて PrP^{Sc} 生成抑制作用を示す 3 種の化合物を新たに発見することに成功した。PrP に結合する化合物の一部が、実際に PrP^{Sc} 生成抑制作用を持つこと示した今回の結果はこのような戦略的手法が抗プリオン薬の開発の上で有用であることを示していると考えられる。

E. 結論

Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法を用いて抗プリオン作用を持つ薬剤である Alprenolol を見出した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Real-Time Quaking-Induced Conversion for Diagnosis of Prion Disease. *Methods Mol Biol.*, 1658: 305-310, 2017
- 2) Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M. Development of radioiodinated acridine derivatives for *in vivo* imaging of prion deposits in the brain. *Bioorg Med Chem.* 25:1085-1093, 2017

2. 学会発表

- 1) Imamura M, Tabeta N, Iwamaru Y, Yokoyama T, Murayama Y, Mori T, Takatsuki H, Atarashi R. Spontaneously-generated baculovirus-derived abnormal recombinant prion protein has infectivity. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (Oct, 24-26, 2017, Osaka, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録

图 1

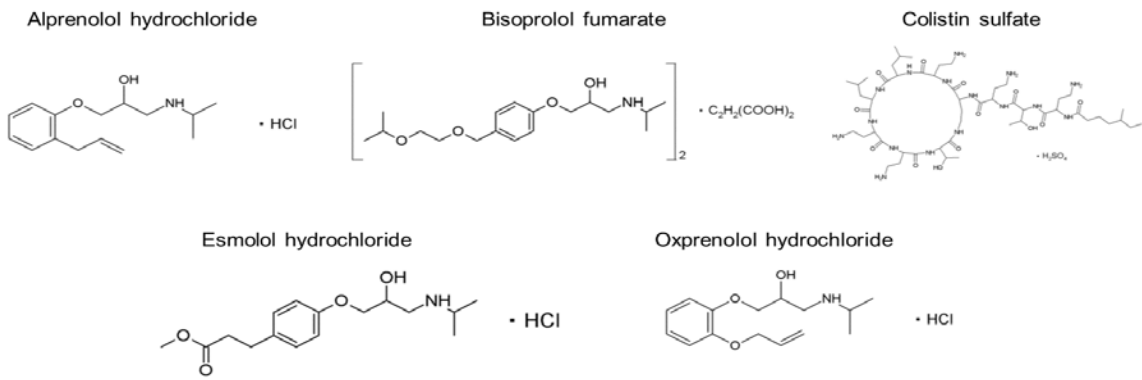


图 2

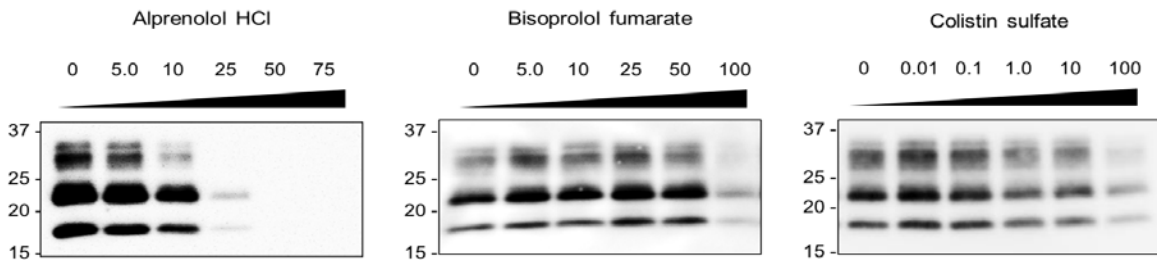


图 3

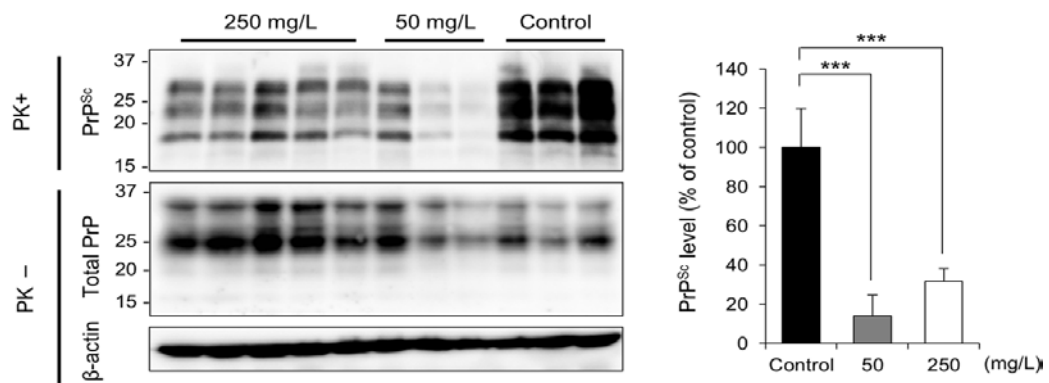


图 4

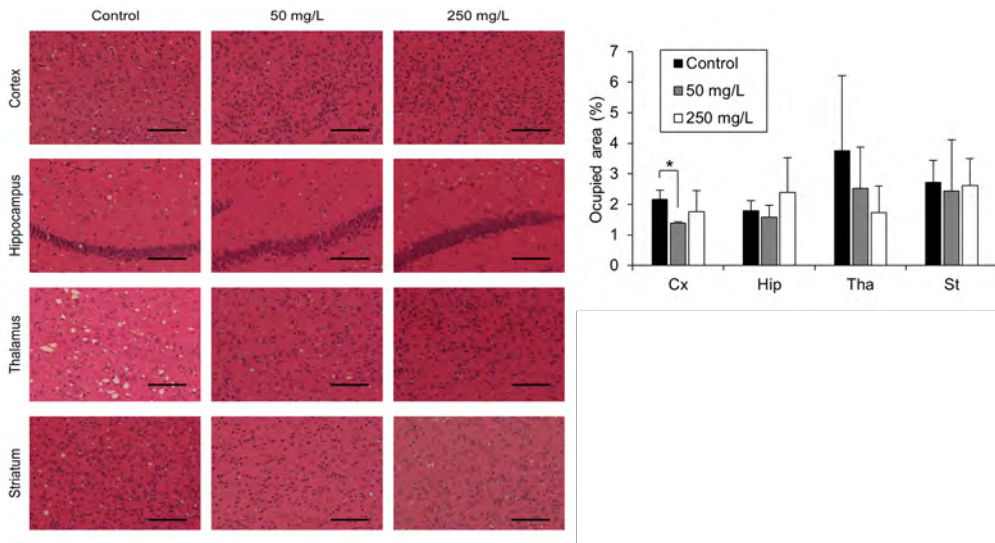
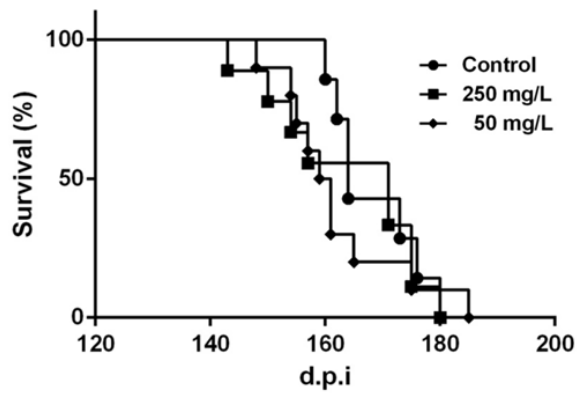


图 5



3. カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価

分担研究者 保富 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

分担研究者 柴田 宏昭 自治医科大学・先端医療技術開発センター
共同利用コーディネーター部門 講師

研究協力者 小野 文子 (千葉科学大学・危機管理学部)

研究要旨

非定型 BSE 由来プリオンの食品を介してのヒトの健康に及ぼすリスクを評価するために、カニクイザルに非定型 BSE 由来プリオンである L-BSE または H-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与した。L-BSE 由来プリオン経口投与ザル 2 頭は、投与後 6 年 3 ヶ月経過し安楽死をおこなったが、2 頭ともその時点までには発症は認められなかった。安楽死直後の脳 MRI 画像でも異常所見は見られなかった。H-BSE 由来プリオン経口投与ザル 2 頭は、投与後 2 年 4 ヶ月経過したが、発症はみられていない。また H-BSE 由来プリオンが種の壁を越えて霊長類に感染するか否かを確認するためにサル 2 頭に脳内接種したが、こちらも投与後 2 年 4 ヶ月経過した現在、未発症であった。L-BSE 由来プリオンを脳内接種したサルは投与後 2 年以内には発症していたことから、H-BSE 由来プリオンは L-BSE 由来プリオンに比べ、霊長類においては発症しにくい可能性が示唆された。引き続き H-BSE 感染ザルの経過観察を行い、安楽死したサルについては網羅的解析を進めていく。

A. 研究目的

定型 BSE (C-BSE) 同様、非定型 BSE (L-BSE、H-BSE) も食品を介してヒトに感染するリスクがある。ヒトに近い霊長類を用いた非定型 BSE の経口感染実験の結果は、食品を介してのヒトへの感染リスク・感受性を評価する上で重要である。既に L-BSE は霊長類に経口感染することが報告されているが、経口投与による H-BSE の霊長類への感染はまだ報告されていない。そこで、霊長類を用いて H-BSE の経口投与実験を行うと共に、H-BSE が霊長類にそもそも感染するか否かを確認するために、H-BSE の脳内接種実験も行い、H-BSE のヒトの健康に及ぼすリスクを評価し、安全対策等に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1) 供試動物と接種方法

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 (茨城県つくば市) で育成された投与時 1.2~2.4 歳の雄カニクイザル 7 頭を用いた。供試動物は、ABSL3 施設内のアイソ

レーターにおいて馴化飼育後、感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27°C、相対湿度 50-60%、12 時間照明 (7 時~19 時) に設定した。アイソレーターの前面及び側面には窓を設け、前方及び隣のサルとアイコンタクト出来る環境とした。飼料は固形飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.) 70g 及びリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

2) 実験群および接種材料

実験群について下記に記載する。

L-BSE 接種群

BSE (BSE JP/24 佐世保) 感染ウシの 20%脳乳剤をカニクイザル 2 頭 (#18、#19) に経口投与 (脳乳剤 5.0 mL x 8 回) した。

H-BSE 接種群

BSE (カナダ由来感染ウシ脳乳剤 (#9458) をウシ脳内に継代接種: 動衛研) 感染ウシの 10%脳乳剤 (0.2 mL) をカニクイザル 2 頭 (#24、#25) に脳内接種、また 20%脳乳剤 (5.0 mL x 8 回) をカニ

クイザル2頭(#26、#27)に経口投与した。

3) 接種および材料採取方法

経口接種は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、前述の量を投与した。脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後、イソジンで消毒し、頭皮膚切開、側頭部頭蓋骨に直径2 mmの穿孔部を作製し、視床に脳乳剤0.2 mLを注入した。注入後、皮膚を縫合し、手術日より3日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

接種前及び接種後は約3ヶ月おきに血液、脳脊髄液(CSF)、唾液及び尿の採取を行った。血液は塩酸ケタミン麻酔下で大腿静脈より採取した。CSFは背部剃毛後イソジンで消毒し、第3～第5腰椎椎間より採取した。鼻腔細胞の採取を試みた。片側鼻腔内を生理食塩水1 mLで3回洗浄を行い、両鼻腔内で計6 mLの洗浄液を回収した。回収した鼻腔洗浄液は2回遠心洗浄を行い、鼻腔洗浄細胞を回収した。

安楽死は塩酸ケタミンにより鎮静後、ヘパリンを静脈内注射し全身血液の凝固防止を行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により行った。安楽死後、脳及び主要臓器の組織の一部を摘出し、凍結保存及びホルマリン浸漬を行った。

4) 解析方法

1. 行動観察

行動観察(神経・精神症状評価)

定期的にビデオ撮影を行い、スコアリングに必要な症状を抽出し、再評価を行った。ビデオ撮影は15分間実施し撮影開始5分後に給餌を行い、摂食行動の観察を行った。神経・精神症状評価の抽出は、下記のヒトプリオン病指標項目について、サルは行動から客観的にスコアリングできる指標を作成した。

プリオン病主要観察項目

- ①神経症状:運動失調、振戦、ミオクロヌス、姿勢反射障害、動作緩慢、痙性歩行、筋力低下、歩行不能
- ②精神症状:抑鬱状態、自傷行為、食欲不振、あくび、驚愕反応、不穏

アップルテスト(運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使

って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

2. 高次脳機能解析

食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルの報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行った。

3. BSE感染ザルの体液中のPrP^{Sc}動態解析

定期的に採材された体液類(血液、脳脊髄液、尿および唾液)について解析を行った。超音波処理/界面活性剤で可溶化した白血球分画またはリタングステン酸沈殿法で濃縮した体液類をシードに用い、連続PMCA法で解析した。各ラウンドのPMCA産物をProteinase K消化後、ウェスタンブロット(WB)法によりPrP^{Sc}を検出した。

4. MRI撮像

P3動物実験区域内で管理されている動物は生存したまま管理区域外への搬出ができないため、MRI撮像は安楽死直後に行った。安楽死したサルはアクリル製密封型コンテナに封じ込めてP2動物実験区域内のMRI室に搬送した。MRI撮像は3T MRI装置(MAGNETOM Allegra [Siemens社])を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高いS/Nを持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルのCP型コイルを用いてT1-3D、T2、プロトン強調画像、Flair画像を撮像した。

(倫理面への配慮)

BSE接種動物はすべてP3アイソレータケージ内に収容した。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

覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とした。ケージ内にはステンレスの鏡やチェーンを入れると共に、定期的に行うアップルテストや食物回収試験により、ヒトとの触れ合いが福祉向上に有効と考え、ケージ内サルのストレスの軽減に努めた。材料採取及び脳波測定は麻酔下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応および輸液療法等による維持管理を行った。

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、過剰量のペントバルビタールナトリウム静脈内投与により行った。

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本指針」を遵守し、医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験委員会の承認を得て行った。病原体の取扱については、医薬基盤・健康・栄養研究所バイオセーフティ委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

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。2 頭とも臨床症状とは関係なく自傷行動を取る傾向があったが、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 (data not shown)、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 (図 1)。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。

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 (data not shown)。引き続き、経過観察中である。

D. 考察

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、その間、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。我々の以前の実験では確認出来なかったが、Lasmézas らのグループは C-BSE 脳乳剤 (5g 相当) 経口投与したカニクイザル 1 頭は 60 ヶ月目で発症し、もう 1 頭は 76 ヶ月未発症であったことを報告している。我々が行った先の感染実験により、L-BSE 脳内接種したサルは、C-BSE 脳内接種したサルより早く発症し、脳内萎縮が顕著であった。従って、L-BSE は C-BSE に比べ病原性が強いと考えられ、経口投与でも L-BSE は C-BSE より早く発症すると想定していた。しかしながら、我々が経口投与した L-BSE 脳乳剤は 8g 相当であったにもかかわらず、75 ヶ月では発症は確認出来なかった。経口による L-BSE のリスクは、C-BSE に比べると低い可能性が示唆された。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た。引き続き、経過観察を行っていく。

E. 結論

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。一方、潜伏期に採取した体液中に僅かに PrP^{Sc} が検出された事を考慮すると、感染はしているが発症するまでに更に時間を要する可能性も考えられた。L-BSE 経口投与ザルの剖検時の各組織中の PrP^{Sc} の測定を行い、

PrP^{Sc}の蓄積の有無を判断する必要があるが、我々が当初想定していた L-BSE の経口による発症リスクは C-BSE と比較して必ずしも高くないことが示唆された。

H-BSE 脳内接種または経口投与ザルは接種後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は認められていない。L-BSE 脳内接種実験と比較して、H-BSE の霊長類への伝播はしにくい可能性が示唆された。引き続き、経過観察を行い、H-BSE のヒト・サルへの感染リスクを評価する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

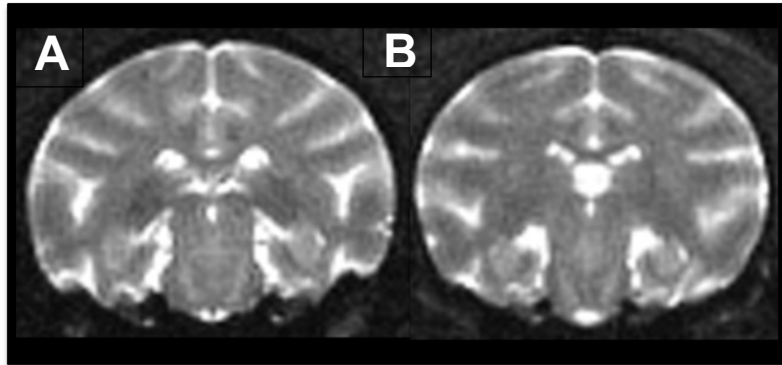


図1 L-BSE 経口投与 75 ヶ月目に安楽死した直後のカニクイザル脳の MRI 画像 (A) #18、(B) #19

4. 非定型 BSE 感染カニクイザルの病理学的解析

分担研究者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究協力者 佐藤 由子 (国立感染症研究所・感染病理部)

研究要旨

定型 BSE は肉骨粉を原因としてウシで蔓延したと考えられており、ヒトへも経口的に感染し vCJD を誘導する。ウシでは定型に加え非定型 BSE の存在も知られており、これらプリオンがヒトへの感染性を有するか否か、また経口感染する可能性について明らかにすることは急務である。本研究班では本邦で確認された非定型 L-BSE (JP24) を経口的にカニクイザルに投与し、経過観察後に安楽殺し各種臓器におけるプリオンの蓄積について病理学的検索を行った。

また、ウシに加え反芻動物であるシカ類においてもプリオン病の存在が報告されている。現在、日本国内ではシカプリオン病である慢性消耗性疾患 (CWD) の発生は報告されていないが、検査体制の構築ならびに清浄確認は必須である。本研究では関東地方に生息する外来種であるキョンについて検査体制の確立ならびにプリオンの存在の有無について検討を行った。

A. 研究目的

1) ウシにおけるプリオン病は定型 BSE に加え非定型 BSE が存在することが報告されている。定型 BSE は肉骨粉を原因としてウシで蔓延したと考えられており、ヒトへも経口的に感染し vCJD を誘導する。一方、非定型 BSE のヒトへの感染事例は現在報告されていないが、動物モデルを用いた研究から非定型 BSE に分類される L-BSE はヒトへの感染性が示唆される。本研究班においてもカニクイザルへの脳内接種により L-BSE がサルへ伝播することを確認している。本研究では C-BSE と同様に経口での L-BSE の伝播の可能性について検討する。

2) シカではプリオン病として慢性消耗性疾患 (CWD) が存在することが報告されている。日本に生息するシカ類は固有種をはじめ外来種も存在し、生息数の拡大に伴いジビエとして食用となる機会が増えている。国内では CWD の発生は報告されていないが、海外では散発的な発生報告が存在し、国内においても検査体制の構築ならびに清浄確認は必要である。本研究では関東地方に生息する外来種であるキョンに対する検査体制の確立ならびにプリオンの存在の有無について検討を行った。

B. 研究方法

1) L-BSE プリオン経口投与サルの病理学的解析
国内で摘発された L-BSE 罹患牛 (JP24) 脳乳剤を経口的に摂取させたサル 2 頭を経過観察の後、安楽殺し各種臓器の病理学的検討を行った。

2) キョン検査体制の確立

関東地方で駆除されたキョンの延髄採取ならびにプリオンたんぱく質遺伝子のシーケンス、使用可能抗体の確認を行った。

(倫理面への配慮)

サルを用いた実験については予医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターの指針を順守するとともに、動物愛護精神に基づき研究を行っている。

キョンの採材に関しては「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」に基づき駆除された個体を使用する。

C. 研究結果

1) L-BSE プリオン経口投与サルの病理学的解析
L-BSE 罹患牛脳乳剤を経口投与した 2 頭のカニクイザルを 6 年超の経過観察の後、安楽殺を行い各種臓器を採取ならびに病理学的検索を行った。

経過観察過程では2頭にプリオン病に特徴的な臨床症状は認められなかった。解剖前のMRI画像ならびに解剖後に摘出された臓器に肉眼的な変化を認めなかった。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(図1)。

2) キョン検査体制の確立

関東地方で捕獲、殺処分されたキョンの延髄組織を採取しプリオンタンパク質遺伝子の配列同定を試みた結果、これまでに報告されている海外のキョンと100%の相同性を有していた(図3)。この細胞性プリオンは抗プリオン抗体であるSAF84により検出が可能であった。

D. 考察

1) L-BSE プリオン経口投与サル病理学的解析

病理学的な検索の結果、プリオンの明らかな沈着は認められなかった。L-BSE由来プリオンはサルへの脳内接種により短期間の潜伏期と高度の空胞変性を伴うプリオン病を誘導することをこれまでに明らかにしており(図2)、経口摂取による感染成立の可能性は低いことが考えられた。今後PMCAおよびRT-Quicを用いた高感度検出法により微量のプリオン沈着の有無について確認を行う。

2) キョン検査体制の確立

海外での研究機関ではキョンをCDWのモデル動物として用いており、プリオンはキョンに感染することが示されている。国内に生息するキョンも100%相同性を有するプリオンたんぱく質遺伝子を有しており、CWDに感染可能なことが示唆された。今後、検査頭数を拡大し国内の清浄確認を行うとともに、RT-Quic等の高感度検出法への適応を検討する。

E. 結論

L-BSE由来プリオンは経口投与後6年を超えてプリオン病特徴的な臨床症状を示さなかった。各臓器においても病理学的な変化は認められず、免疫組織的な検索においてもプリオンの沈着は認められなかった。これらより、経口によるL-BSEのサルへの感染の可能性は低いものと考えられた。

2) キョン検査体制の確立

関東地方に生息するキョンのプリオンたんぱく質遺伝子配列はすでに報告されている海外のキョンと同じであった。抗プリオン抗体SAF84によりキョンプリオンたんぱく質の検出が可能でありウエスタンブロット法を用いたCWD検索を行えることが明らかとなった。さらに高感度に検索するためRT-Quic法を用いた試験法へ供出するとともに検査頭数を増やし国内のCWD清浄確認を進める。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S. Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice. *Biochem Biophys Rep.* 2017 Oct 13;12:166-171.
- 2) Hagiwara K, Iwamaru Y, Tabeta N, Yokoyama T, Tobiume M. Evaluation of rapid post-mortem test kits for bovine spongiform encephalopathy (BSE) screening in Japan: Their analytical sensitivity to atypical BSE prions. *Prion.* 2017 Mar 4;11(2):113-127.

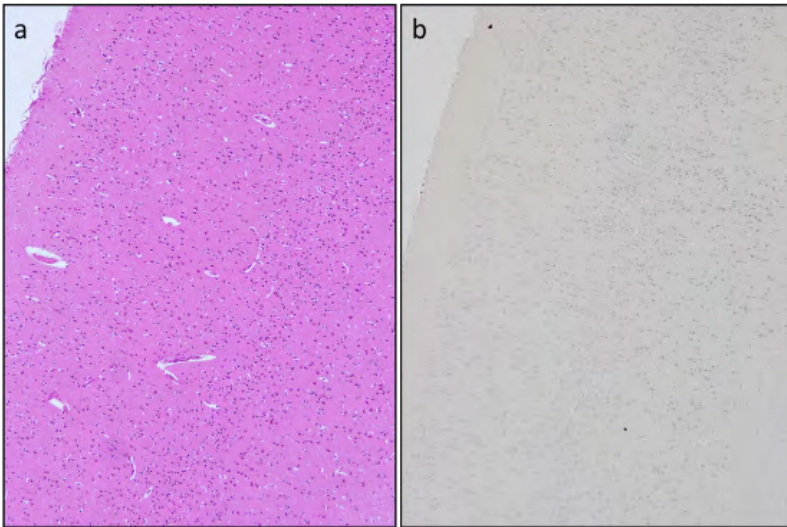
2. 学会発表

- 1) Tobiume M. Experimental transmission of classical and atypical Bovine Spongiform Encephalopathy to Cynomolgus Macaques, LIKA symposium 2017 UPF/LIKA Recife, Brazil

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. なし
2. 実用新案登録
なし

図 1

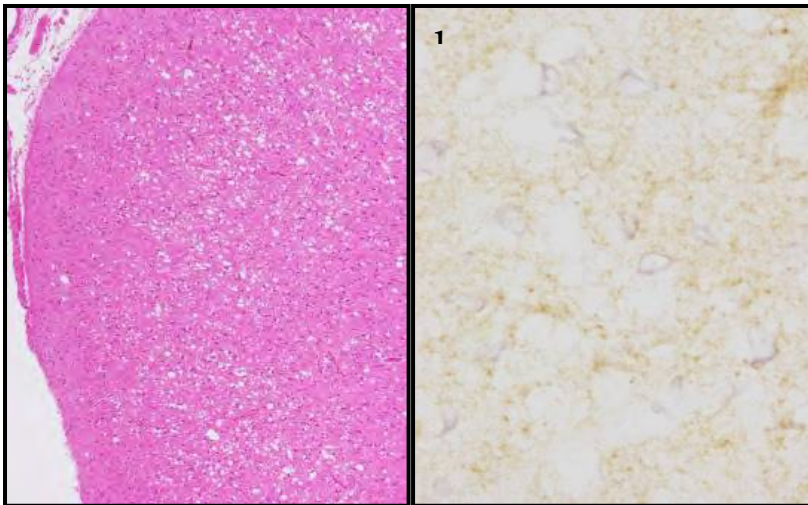


L-BSE プリオン経口投与サル大脳皮質

a) HE 染色 b) プリオン染色 (抗プリオン抗体 T4)

プリオン病に特徴的な空胞形成は認められず、プリオンの沈着も認められなかった。

図 2

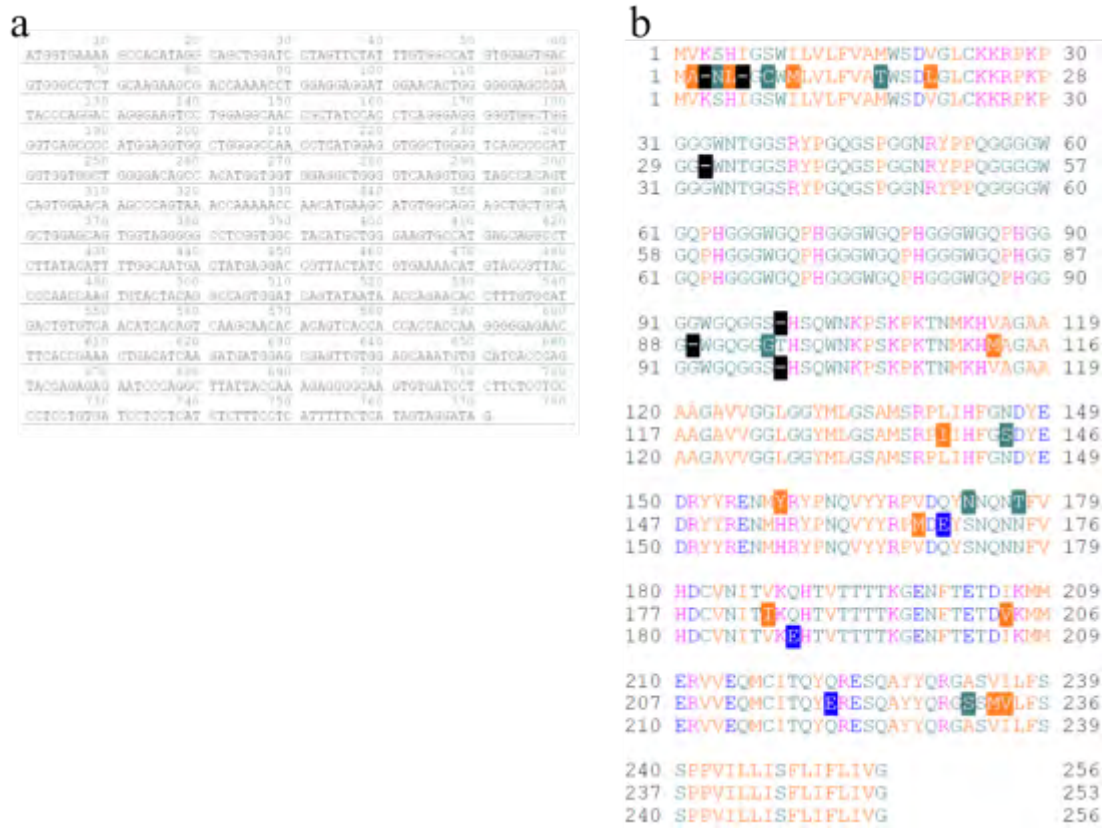


L-BSE 脳内接種サルの大脳皮質

a) HE 染色 b) プリオン染色 (抗プリオン抗体 T4)

L-BSE プリオンの脳内接種により高度の空胞変性が誘導され、シナプスタイプのプリオン沈着が認められる。

図 3



- a) 国内に生息するキョン Prnp cDNA シークエンス。既知の Reeves's muntjac (キョン英名) cDNA 配列と 100%の相同性を有する。
- b) キョン、ヒト、ウシ (ホルスタイン) プリオンたんぱく質アミノ酸配列。
上: キョン、中: ヒト、下: ウシ

5. ウシ C-/L-BSE プリオンの生化学的な判別および霊長類モデルへの伝播後の特性解析

分担研究者 萩原 健一 国立感染症研究所・細胞化学部 第1室室長

研究協力者 柴田 宏昭 (自治医科大学 先端医療技術開発センター)

小野 文子 ((千葉科学大学・危機管理学部)

飛梅 実 (国立感染症研究所 感染病理部)

研究要旨

C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの PrP^{Sc} の生化学特性の違いを探索した結果、耐熱性プロテアーゼであるパパインを用い、pH および温度条件をコントロールすると、BSE 罹患ウシ脳組織に由来する C-BSE プリオンと L-BSE プリオンのパパイン抵抗性に差が認められることを H28 年度に報告した。本年度は追試を重ねて、この特性が再現的であることを確認した。このような PrP^{Sc} の生化学特性の相違は、ウシの C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの判別法に応用でき、従前の判断指標を相補する有用な方法になると考えられる。また、L-BSE プリオンがウシからヒトへ感染・伝播した場合を想定し、ウシからカニクイザルへ L-BSE プリオンが伝播することにより、伝播宿主 (カニクイザル) において C-BSE プリオンが新たに出現するかという点を調べた。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において、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の 2 代伝播 (脳内接種) を経ても、C-BSE プリオンが出現・増殖する可能性は低いことを示した。

A. 研究目的

1987 年に Wells らによって報告された従来型 BSE (C-BSE) は英国から欧州各国などへ急速に拡散し、本邦でも食肉牛検査ならびに死亡牛検査により C-BSE 罹患ウシが摘発された。この期間に、ウシ畜産物を介した C-BSE プリオンのヒトへの経口感染により変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) が発生し、大きな社会問題となったことは周知のとおりである。本邦を含めた各国の BSE スクリーニング/サーベイランス、危険部位の除去、飼料規制、などのその後の対策により C-BSE 罹患ウシの発生頭数は着実に減少し、国際獣疫事務局の集計などによれば直近は各年 5~20 頭で推移している。一方、2000 年代半ばに見出された非定型 L-および H-BSE は、各年で 4~14 頭 (L-および H-BSE の合算数) が継続的に報告されている。非定型 L-および H-BSE の今後の発生推移の予測は不確かだが、散発的な発生が一定頻度で持続するのではないかと推測される。このような今

後の予想される状況では、BSE 罹患ウシが摘発された場合に、C-、L-、H-BSE のどの型に当てはまるのかという判別が以前にも増して重要になってくるだろう。

C-、L-、H-BSE プリオンの判別には、PrP^{Sc} の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での糖鎖型比と泳動度の相違、脳組織の病理像、などの指標が総合的に用いられている。しかし、C-、L-、H-BSE プリオンに該当しない、第四の未知の型がもしかしたら発生するかもしれないという可能性も見据えて、判別のための指標や分析法が多いことが望まれる。C-、L-、H-BSE プリオンに選択的な RT-QuIC 法の開発はこの要求に応えるものであるが、本分担研究では RT-QuIC 法とは別のアプローチとして、C-、L-BSE プリオンの PrP^{Sc} の生化学的特徴を検討することで、C-、L-BSE プリオンの判別に資する指標を得ることを目的とした。

また、vCJD と疫学的関連が確立している C-BSE プリオンと比較して、非定型 BSE プリオンが異種

動物へ伝播する場合、その伝播後の特性については未知の点が多い。例えば、L-BSE プリオンをヒツジ [Vet Res, 46, 81 (2015)] や近交系マウス [PLoS Pathogens, 3, e31 (2007)] へ実験的に伝播させると、C-BSE プリオンに相当するような特性を獲得するという報告がある。また、本研究班による L-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播実験において伝播後に PrP^{Sc} の生化学的特徴が C-, L-BSE プリオン間で判別し難くなった。これらの事象から、L-BSE プリオンがヒトを含む霊長類に伝播すると C-BSE プリオン様の特性を獲得するのではないかという可能性が浮かんた。そこで本分担研究では、L-BSE プリオンがウシからカニクイザルへ伝播を経ることによって C-BSE プリオンが新たに出現するかという点を調べ、L-BSE プリオンについての知見を拡充することを目的とした。

B. 研究方法

1) BSE 罹患ウシ (JP6, JP10, JP24) の脳ホモジネートを 2% Zwittergent 3-14 / 0.5% sarkosyl / 0.1M NaCl を含む 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5 @24°C) または 50mM PIPES 緩衝液 (pH6.8 @24°C) または 50mM HEPES 緩衝液 (pH8.4 @24°C) 中で、37 ~78°C の温度条件でパパイ (Worthington 社、終濃度 0.4unit/ml) により 30min 間消化した。消化反応液に 0.5 倍容の 10mM PMSF (ブタノール/メタノール (5/1, v/v) に溶解) を添加後、16,000xg で 15min 遠心して得られる沈殿物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、抗プリオン蛋白質抗体を用いるウエスタンブロット法によりパパイ抵抗性の PrP^{Sc} 断片を検出した。また、酸性条件下でのペプシン消化に対する PrP^{Sc} の抵抗性を調べるために、BSE 罹患ウシ (JP6, JP24) の脳ホモジネートを 2% Zwittergent 3-14 / 0.5% sarkosyl / 0.1M NaCl を含む 50mM グリシン緩衝液 (pH2.2 @24°C) 中で、ペプシン (Sigma 社) により 40°C、60min 間消化し、ウエスタンブロット法により PrP^{Sc} 断片を検出した。

2) C-BSE プリオンあるいは L-BSE プリオンを 2 代継代させたカニクイザル (C-BSE プリオン継代ザル #017 ; L-BSE プリオン継代ザル #022) の大脳前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種し、マウスに対する病原性を比較・追跡した。マウスへの接種に際しては、#017 と #022 の前頭葉ホモジネートのプロテアーゼ K 消化物をウエ

スタンブローティングにかけ、接種するホモジネート中の PrP^{Sc} のシグナル強度が等しくなるようにホモジネート濃度を調節した。

3) 研究班で新たに着手したカニクイザルへの H-BSE プリオンの感染・伝播実験にあたり、実験に供するカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子 (*prnp*) の塩基配列解析を行った。白血球画分から得たゲノム DNA を鋳型として、センスプライマー: 5'-TTC ATC AAG TCC ATA ACT TAG GGT CAG-3'、アンチセンスプライマー: 5'-CCT ATC AGG GAC AAA GAG AGA AGC AAG-3'、および KOD plus polymerase を用いた PCR により、PrP コード領域を含む (-339~+883) DNA 断片を得た。この DNA 断片 (PCR 産物) から 1 本鎖 DNA を調製し、dideoxy 法により塩基配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

プリオンの取扱いは、国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」を遵守し、「実験室安全操作指針」に従った。マウスへの伝播実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「国立感染症研究所動物実験実施規程」および「実験動物の飼養・管理・苦痛の軽減に関する基準」を遵守し、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1) 昨年度に、C-および L-BSE 罹患ウシの脳ホモジネートをパパイで消化後、ウエスタンブロット分析により PrP^{Sc} を検出すると、高温 (およそ 68°C 以上) かつ弱塩基性 (およそ pH8.0) の消化条件において C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの PrP^{Sc} のパパイ抵抗性に明らかな差が認められることを見出した。本年度は追試を重ね、このような両プリオンの差異が再現的に観察できることを確認した [図 1 A]。

一方、昨年度に、C-BSE 罹患ウシの脳ホモジネートを高温 (およそ 60°C 以上) でパパイによって消化すると、37~40°C でパパイによって消化した場合よりもウエスタンブロット分析で検出される PrP^{Sc} の泳動度が少し高分子量側へシフトするという現象を認めた。この現象がウシ C-BSE プリオンに特徴的であることを確立すべく、本年度に追試を重ねた。ところが、追試を重ねるうちに本現象の再現ができなくなった。再現不能とな

った原因の究明にあたったが、今年度中に特定できなかつた。

また本年度は、プロテアーゼ消化の際の pH レンジを酸性側へ広げ、pH2.2 においてペプシンによる消化を検討した。この背景には、本研究班の L-BSE プリオンのカニクイザルへの経口投与実験において、感染が成立する量であろうと予想した量の L-BSE プリオンを投与したカニクイザルが予想に反して発症しなかつたことから、L-BSE プリオンが胃内で分解される可能性を考えたためである。調べた結果、酸性条件下でのペプシン消化では、C-BSE プリオンに比べて L-BSE プリオン由来の PrP^{Sc} が顕著に消化・消失することはないことがわかつた [図 1 B]。(トリプシンやキモトリプシンによって、L-BSE プリオン由来の PrP^{Sc} が消失しないことは、以前に調べてある。)

2) 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常である [図 2]。

3) 実験に供するカニクイザルの *prnp* の塩基配列解析を行った。その結果、H-BSE プリオンを経口投与した 2 頭のカニクイザルの内の 1 頭 (#026) が、片方のアレルにおいて、PrP のオクタペプチド・リピートをコードする塩基配列部分にリピート 1 回の欠失があることが PCR 分析から推定され [図 3]、さらに DNA シークエンシングによるヌクレオチドレベルでの配列分析により欠失を確認した。この個体の家系について調べたところ、父方の祖父を共通とする複数の個体に同様の変

異が認められた (図 3 には、この家系に属する #028 の PCR 産物を並べて示す)。

D. 考察

ウシ L-BSE プリオンは、高温 (およそ 68°C 以上) かつ弱塩基性 (およそ pH8.0) 条件下でのパパイ消化より PrP^{Sc} 断片が消失した。パパイ消化は pH8.0 よりも pH6.8 の方が酵素活性が高いが、pH6.8 の高温条件では L-BSE の PrP^{Sc} は消失しない。よって、PrP^{Sc} の消失はパパイ消化活性の亢進が原因ではなく、高温かつ弱塩基性の条件に L-BSE プリオンが晒されたことによる、L-BSE プリオンに特異的な構造緩和によると推測された。どのような構造緩和が起こるのかという点は、プリオン株の特性や PrP^{Sc} の凝集体構造を考える上で、興味深い。

一方、昨年度に再現的に観察できた、C-BSE プリオンの PrP^{Sc} 断片の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での泳動度シフトが、本年度に追試を重ねていくうちに再現的できなくなつた。保管しておいた昨年度のパパイ消化物を並べて電気泳動にかけると、保管しておいた消化物では PrP^{Sc} の泳動度シフトが認められるので、再現不能の原因は電気泳動以前のパパイ消化条件が制御できていないことにあると考えられる。

また、C-/L-BSE プリオンを pH2.2 においてペプシンによる消化にかけ、消化後にウェスタンブロット分析にかけたところ両プリオンともに PrP^{Sc} が検出された。L-BSE プリオンを経口投与したカニクイザルが外見的には発症しなかつた (今後、採材した神経組織等の PrP^{Sc} を詳しく検索する計画) が、L-BSE プリオンが胃内ですみやかに分解されるとは考えにくい結果であつた。なお、カニクイザルへの L-BSE プリオンの経口感染が成立したという情報はワークショップでの発表がある (Workshop on the epidemiology of human and animal TSEs, 30 April 2010, Torino, Italy) が、その詳細に関する論文等は未だ見当たらない。

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。

本研究班で用いたカニクイザルについては、*prnp* の塩基配列解析を逐一行っており、アミノ酸置換を伴う変異はこれまで無かった。今回、オクタペプチド・リピートのリピート1回を欠失した heterozygous な個体が初めて見つかった。この個体 (#026) には H-BSE プリオンを経口投与済みであり、同じく H-BSE プリオンを経口投与した他の1頭には欠失はない。この2頭に、プリオンの感受性の差が認められるのか、今後の経過が興味深い。なお過去の文献を調査したところ、カニクイザルについてはこの変異の報告は見当たらなかったが、ヒトでの変異は論文報告があった (Hum Mol Genet, 2: 541 (1993))。論文では、この欠失と CJD との因果関係は無いと結論されている。

E. 結論

本年度は以下の成果を得た、

- PrP^{Sc} の生化学的解析にパパインを用いることで、ウシ脳に蓄積した L-BSE プリオンに特徴的な性質を再現的に確認した。この PrP^{Sc} の生化学特性は、ウシの C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの判別に応用でき、従前の判別指標を相補する有用な方法になると考えられた。
- L-BSE プリオンをカニクイザルへ2代伝播(脳内接種)させても、L-BSE プリオンから C-BSE

プリオンが出現する可能性は低いことを示した。

- 本研究班の研究に供したサル個体の中では初めて、オクタペプチド・リピート配列のリピート1回分を片方のアレルで欠失した個体を見つけ、家系の遺伝的背景も追跡できた。文献検索により、この欠失変異はヒトでも既知であることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

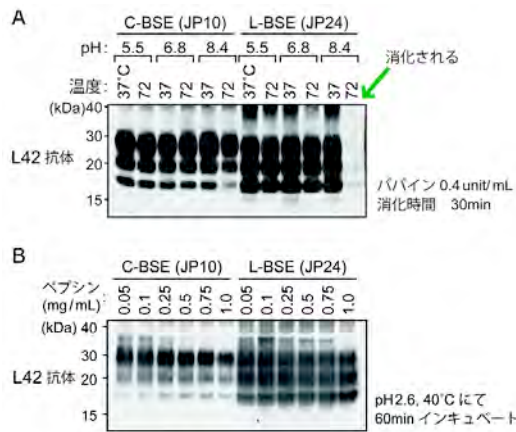


図1 ウシ C-/L-BSE プリオンのパルパイン消化による生化学的な判別 (A) とペプシン消化に対する抵抗性 (B)

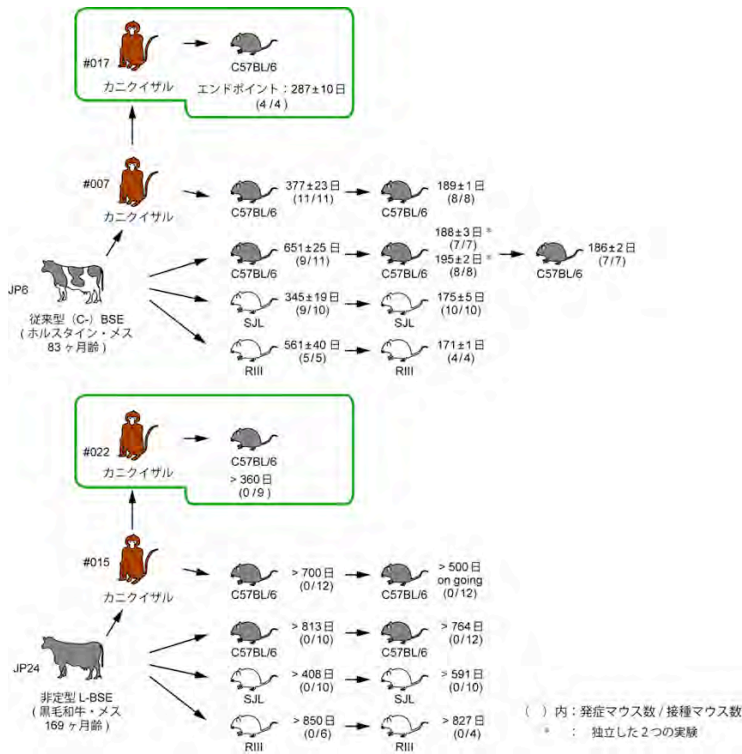


図2 カニクイザルへ2代継代した C-/L-BSE プリオンの病原特性についての C57BL/6J マウスを用いた一連のバイオアッセイの結果。本年度は緑枠内のバイオアッセイを行った。

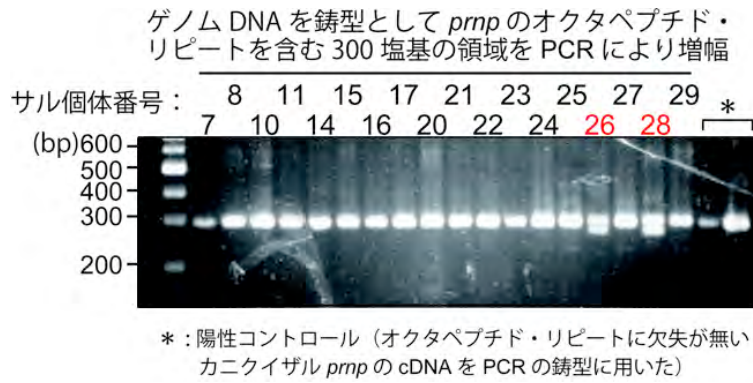


図 3 カニクイザル *prnp* のオクタペプチド・リピート領域の PCR 産物のアガロース電気泳動像。サル個体番号#026 と#028 では、リピート 1 回分の欠失により PCR 産物が 2 本のバンドとなる。

6. 非定型（H型）BSE感染牛の潜伏期間におけるPrP^{Sc}蓄積

分担研究者 福田 茂夫 北海道立総合研究機構・畜産試験場・基盤研究部

家畜衛生グループ 主査

研究要旨

脳内接種によるBSE感染により、非定型（H型）BSE感染牛の潜伏期間でのPrP^{Sc}の脳内出現時期と部位を明らかにする。またこれまでに実施した定型および非定型（L型）BSEと比較し、BSEのPrP^{Sc}の検出可能な期間を明らかにし、適切な管理措置の策定に貢献する。本年度は、非定型（H型）BSE10%脳乳剤を導入し、ホルスタイン種雌牛に脳内接種し非定型（H型）BSE感染牛（n=2）を作出した（平成29年11月およびH30年1月）。脳内接種前後の比較からは接種による臨床上的影響は見られず、2018年3月現在、非定型（H型）BSE感染牛に音への過剰反応や歩様の変化等のBSEを疑う臨床症状等は観察されていない。次年度に潜伏期間におけるPrP^{Sc}蓄積を解析する。

A. 研究目的

牛海綿状脳症（BSE）は、羊のスクレイピー、鹿の慢性消耗症、人のクロイツフェルト・ヤコブ病などと同様に伝達性海綿状脳症の一つで、感染性蛋白粒子プリオンの感染によって起こることからプリオン病とも呼ばれている。なかでもBSEは、人の変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因となる人獣共通感染症で、公衆衛生上重要な疾病である。

1986年に英国で初めて確認されて以来、BSEは1種類のプリオン株（定型BSE）が原因と考えられてきたが、2003年からこれまでに100例以上の非定型BSEが日本を含む世界中で散発的に確認されている。非定型BSE患者は、ほとんどが8歳以上の高齢牛で、定型BSEの発生状況との関連性が低いことから、孤発性（自然発生的）であることが示唆される。道総研畜産試験場では、これまでに脳内接種による定型または非定型（L型）BSEの牛への感染試験を実施し、定型BSEでは、臨床症状と発症時期、異常プリオンタンパク質（PrP^{Sc}）の出現部位を明らかにした。また、非定型（L型）BSEは、臨床症状の出現時期が定型BSEよりも早いことから、そのプリオンは牛に対して病原性が強いことが示唆された。しかし、非定型BSEの人へのリスクや発生機序などは未解明な点も多くあり、BSE対策の残された問題として、消費者から原因究明を要望する声が挙がっている。

本研究では牛への脳内接種によるBSE感染実

験により、非定型（H型）BSE感染牛の潜伏期間内でのPrP^{Sc}の脳内出現時期および部位を明らかにし、定型および非定型（L型）BSEと比較検討することでBSEの感染および発症機序の解明に資する。

本年度は、非定型（H型）BSE感染牛の脳乳剤を導入し、脳内接種により、非定型（H型）BSE感染牛を作出し、経過を観察した。

B. 研究方法

1) 非定型（H型）BSE感染牛のPrP^{Sc}の脳内出現部位と経時的蓄積量

ホルスタイン種雌牛3頭を用いた。各供試牛は麻酔処置し、直径2mmのピンドリルで前頭骨右側を貫通し、その貫通穴より18Gのカテラン針を用いて中脳を標的に穿刺し、非定型（H型）BSE感染牛の10%脳乳剤（n=2）またはBSE非感染牛の10%脳乳剤（n=1）を1ml脳内接種した。術後はBSE隔離牛舎にて飼養し、経過観察を行った。BSE非感染牛の10%脳乳剤接種牛（BSE陰性対照牛）は接種後5か月で病理解剖し、PrP^{Sc}をウエスタンブロット法で解析した。

（倫理面への配慮）

サンプル採取および分析は、研究従事者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構にお

けるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) 非定型 BSE 感染牛の PrP^{Sc} の脳内出現部位と経時的蓄積量

農研機構動物衛生研究部門より非定型 H 型 BSE 感染牛の脳乳剤を導入し、ホルスタイン種雌牛に脳内接種し、非定型 (H 型) BSE 感染牛 2 頭を作出した (平成 29 年 11 月および H30 年 1 月)。脳内接種前後の比較からは接種による臨床上的変化はなかった。これまでに音への過剰反応や歩様の変化等の BSE を疑う臨床症状等は観察されていない。

D. 考察

非定型 (H 型) BSE 感染牛の脳乳剤の牛への脳内接種では、接種後約 12 か月で発症し、接種後 18 か月で起立不能等飼養困難となると報告されている (Okada ら、2011)。我々のこれまでの研究では、非定型 (L 型) BSE 感染牛の脳乳剤の牛への脳内接種では、接種後約 11 か月以降に発症し、接種後 16 か月で飼養困難となる (Fukuda ら、2011)。また非定型 (L 型) BSE の脳乳剤の牛への脳内接種では、接種後 4.7 か月で脳内 PrP^{Sc} を検出している。現在経過を観察中であるが、2018 年 3 月現在、

臨床上的変化は見られず、非定型 (H 型) BSE 接種牛からの脳内 PrP^{Sc} 蓄積は、接種後約数ヶ月が見込まれ、次年度に潜伏期間における PrP^{Sc} 蓄積を解析する。

E. 結論

牛への脳内接種による臨床上的影響はなかった。2018 年 3 月現在、音への過剰反応や歩様の変化等の BSE を疑う臨床症状等は観察されていない。次年度に脳を採取し、脳内 PrP^{Sc} の出現部位と蓄積量について、ウェスタンブロット法を用いて調査する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

以下に図表を入れて下さい。

表1 非定型 H 型 BSE の牛への感染試験の実施と経過

試験牛	接種材料 (10%脳乳剤)	接種月	解剖	観察月数	症状 (2108/3 現在)		PrP ^{Sc}
					音への 反応	歩様	
1608	H 型 BSE	H30/1	H30/4 予定	3 か月	-	-	
1610	H 型 BSE	H29/11	H30/4 予定	5 か月	-	-	
1599	BSE 陰性	H29/7	H29/12	5 か月	-	-	-

7. BSE、非定型 BSE 感染動物の病態解析 —異種間伝達実験による非定型 BSE の起源に関する研究—

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学・獣医学研究部門 教授

研究要旨 非定型 BSE は生化学的性状、病変分布や PrP^{res} の沈着様式が BSE とは異なるプリオン株で、由来を含め不明な点が多い。本邦で発生した非定型 BSE の一つである L 型 BSE と BSE の関連について、実験動物による馴化株の異種間伝達により検討することを目的として研究を計画した。本年度は感染成立までに時間を要していること、予定していたハムスターからモルモットへの動物種間に伝達性が確認されなかったことから当初予定していた結果は得られていない。本年度は、本研究の基盤となる BSE 感染モルモットの病理発生機序に関して検討したのでその結果を記載した。脳内接種による BSE 感染モルモット小脳では、クールーや 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^{res} 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。VGlut2 陽性シナプスに変化はみられなかった。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、重度では苔状ロ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。

A. 研究目的

本研究は、プリオン株の異種間伝達実験を継続して実施し、BSE と非定型 BSE の関連、およびその起源に関して検討することを目的としている。

これまでの研究から、プリオン感染では伝達可能な種間において、動物種と伝達されたプリオン株の組み合わせにより、病理学的に特徴的な所見を示すことがあきらかにされている。我々の研究では、BSE が伝達されたモルモットでは、小脳顆粒層の顕著な脱落と分子層の菲薄化による小脳皮質の萎縮を特徴とし、病変部に一致して顕著なプリオン沈着が認められる。また、PrP^{res} の沈着パターンとして、微細顆粒状の他、プラーク状の沈着が特徴である。非定型 BSE が伝達されたハムスターでは、大脳皮質軟膜下への PrP^{res} の蓄積や微細顆粒状の PrP^{res} 沈着パターンを主体とし、プラーク状や放射状の沈着が見られないという報告がされている。これに加え、PrP^{res} の海馬への顕著な沈着と血管や神経細胞周囲への小型斑状沈着が特徴として確認されている。

本実験では、これらモルモット、ハムスターにみ

られる特徴的病理所見を指標とし、病理学的所見がどのように変化するかを検索する。BSE、非定型 BSE それぞれに伝達性を示した動物種から伝達性を示さなかった動物種へその馴化株の交差伝達を行い、そこで伝達性が成立した場合には、動物種を元に戻して次の代へさらに感染を行う。その中で見られたプリオン伝達動物の病理像を、先述した特徴的な所見について比較することで、種間伝達によりプリオン株の表現型の変化や一貫性を評価する予定である (図 1)。

本年度は、動物感染実験に時間を要していること、予定していた動物種間において伝達性が確認できなかったことから、本研究の主目的については結論が得られていない (実験 1)。そこで、本研究の基盤となる BSE 感染モルモットにおける小脳病変形成機序について検討したので報告する (実験 2)。

B. 研究方法

実験 1

1) 供試動物、接種材料および接種方法

シリアンハムスター (Slc:Syrian), モルモット (Slc:Hartley)をそれぞれ6匹(いずれも,日本SLC,雌,4~5週齢)を使用した。陰性対照としてシリアンハムスターおよびモルモットを1匹ずつ使用した。

接種材料は, BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株 (BSE/gu) をハムスターに接種, 感染させた 10%脳乳剤 BSE/gu/ham および感染研より分与された非定型 BSE 感染ウシの脳材料 (BSE/JP24) 由来の L 型 BSE ハムスター馴化株 (LBSE/ham) を用いて作製した 2.5%脳乳剤を使用した。

BSE/gu/ham 脳乳剤, LBSE/ham 脳乳剤をモルモットに 50 μ l を接種量とし, イソフルラン吸入麻酔下の動物へ脳内接種を行った。

2) 病理学的検索

接種動物は, 臨床症状はみられなかったが, 試験的に接種後 480 日~500 日目にエーテル麻酔下で安楽殺し, 解剖および採材を行った。

採材した臓器は, 10%中性緩衝ホルマリンで固定後, 切り出し, 再固定を行った。次に 98%ギ酸中で 1 時間振盪し, PrP^{res} の感染性を消失させた。その後, 脱水, パラフィン包埋を実施し, 3 μ m パラフィン切片を作製後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

免疫組織学的検索では, 一次抗体として抗 PrP^{res} ウサギポリクローナル抗体である B103 抗体, 二次抗体には HRP 標識ウサギ抗体 (Dako Envision Kit, DAKO, U.S.A.) を用いた。PrP^{res} の免疫活性の賦活化には 135DWHA 法を用いた。その他の抗体による免疫染色の前処理には, オートクレーブ法 (121 $^{\circ}$ C, 10 分) を実施した。

実験 2

1) 供試動物, 接種材料および接種方法

モルモット (Slc:Hartley, 日本 SLC), 雌, 4~5 週齢) を 3 匹使用した。陰性対照として 1 匹使用した。接種材料は, BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株 (BSE/gu) をモルモットに接種した。接種方法は実験 1 に準ずる。

2) 病理学的検索

実験 1 の抗体に加え, VGlut1 抗体, VGlut2 抗体, EAAT4 抗体による検索を実施した。

3) 電子顕微鏡学的検索

矢状断にした小脳皮質を 1mm 角に切り出し, 4 $^{\circ}$ C 下でグルタルアルデヒドにより 4 時間固定, さらに四酸化オスミウム固定液で 4 時間固定した。その後 98%ギ酸で 1 時間の処理を行い, 感染性を消失させ, 常法に従い脱水, Resin 包埋を行った。超薄切片を作成, 電子顕微鏡にて観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

実験 1 の病理学的検索結果では, いずれの動物についても, 免疫組織化学的検索で陽性結果は得られなかった。

実験 2 の対照動物, BSE 感染モルモット小脳と脳幹を VGlut1, VGlut2, EAAT4 抗体をマーカーとし, それぞれの陽性シナプスについて免疫組織化学的検索を行った。対照動物では苔状線維や平行線維には VGlut1、登上線維には VGlut2、プルキンエ細胞樹状突起シナプス後膜には EAAT4 がそれぞれ特異的に発現していた。歯状核, オリブ核, 橋核, 前庭神経核は いずれも VGlut2 陽性, また, 前庭神経核と橋核は VGlut1 にも陽性を示した。BSE 感染モルモットでは VGlut1 陽性シナプスが分子層と顆粒層において減少していた (図 2)。VGlut2 陽性シナプスおよび EAAT4 陽性を示すシナプスについて減少はみられなかった。また, 前庭神経核と橋核の VGlut1 陽性シナプスの減少が選択的に見られた (表 1)。

電子顕微鏡による検索では, 陰性対照の顆粒層では, 多数の顆粒細胞に囲まれた苔状ロゼットと呼ばれる顆粒細胞樹状突起爪状終末と苔状線維で形成されるロゼット状シナプスが認められた。感染動物では, 大部分の顆粒細胞は保存されている一方で, 苔状線維は消失し, 変性した電子密度の増加した顆粒細胞樹状突起爪状終末が散見された (図 3)。

D. 考察

図 1 で示したうちの実験 1 に該当する部分である BSE/gu/ham 株のモルモットへの伝達, 非定型 BSE/ham 株のモルモットへの伝達については確認できなかった。引き続き経過観察を実施する予定である。

実験 2 で示した BSE 感染モルモットの小脳病変の発生機序については図 4 にまとめた。

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。プルキンエ細胞樹状突起や登上線維が保存されていることから, PrP^{res} は主に顆粒細胞を傷害することで小脳皮質の特徴的な病変を形成するが示唆された。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^{res} 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。このように BSE 感染モルモットはヒトプリオン病に類似する小脳病変を形成するだけでなく、病変発生機序も類似していると考えられた。

今回経時的な検索結果については省略したが、プリオンは顆粒層に存在する苔状線維、顆粒細胞樹状突起爪状終末、顆粒細胞の順に傷害し、最後に分子層に存在する顆粒細胞神経突起である平行線維を傷害するという経時的な変化をもたらすことが分かった。

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、大脳皮質一橋一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、系統の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。

E. 結論

本年度は、BSE/gu/ham および非定型 BSE/ham のモルモットへの異種間伝達試験が確認できなかった。

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り、これらの解析結果を踏まえ、次年度以降の異種間伝達試験における病理像の解析に対して有用な知見が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

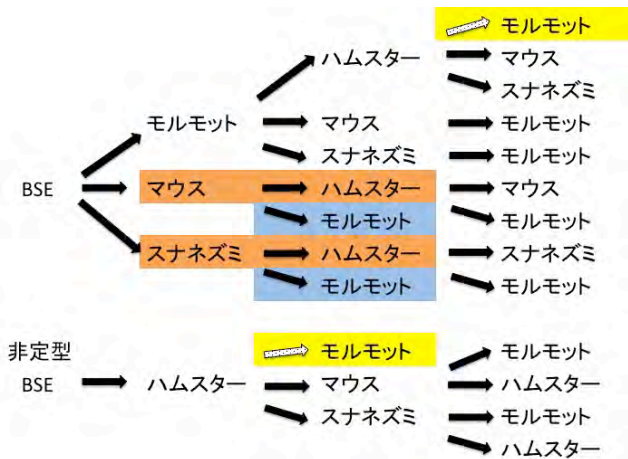
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

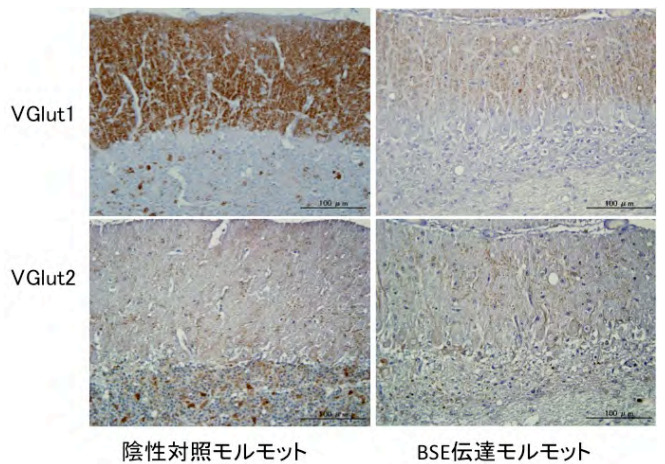
なし

図1. 異種間伝達実験の概要



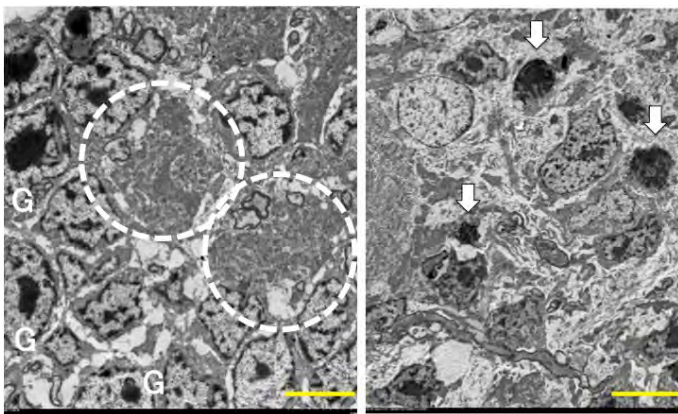
黄色部分については継続して実施していた実験の一部であり、本年度の結果として、hamsterからモルモットへの伝達性はみられなかった。

図2. 小脳分子層、顆粒層免疫染色結果



感染動物では VGlut1 抗体で標識される平行繊維が減少、VGlut2 抗体で標識される登上繊維は健常。両抗体により標識される顆粒細胞層苔状繊維はいずれも減少がみられた。

図3. 小脳顆粒層電顕像



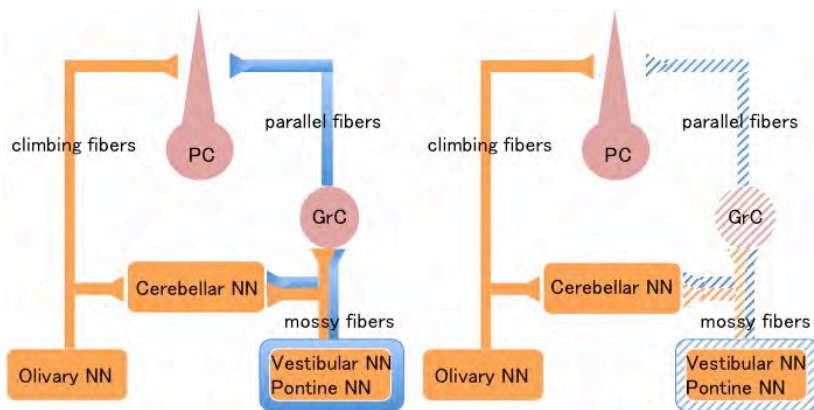
矢印で示した残存している顆粒細胞は萎縮し、核のクロマチン凝縮や細分化がみられる。対照動物に観察された点で囲んだ苔状ロゼットはみられない。

表1. 免疫染色結果

	VGlut1		VGlut2	
	Control	Infected	Control	Infected
Parallel fibers	+	-	-	-
Mossy fibers	+	-	+	-
Climbing fibers	-	-	+	+
Granular cells	-	-	+	-
Cerebellar nucleus	-	-	+	+
Vestibular nucleus	+	+(but weak)	+	+
Pontine nucleus	+	+(but weak)	+	+
Olivary nucleus	-	-	+	+

対照動物で VGlut1 陽性を示す平行繊維、苔状繊維、前庭神経核、橋核で、感染動物は消失ないし減弱を示す。黄色で示す VGlut2 陽性の登上繊維、齒状核、オリーブ核で変化はみられない。

図4. モルモット小脳病変発生機序



水色は VGlut1 陽性、黄色は VGlut2 陽性。斜線部分がプリオンの沈着に伴い、消失あるいは減少を示した部分。プリオンが VGlut1 抗体によりラベルされるシナプスを特異的かつ系統的に傷害する顆粒層型小脳変性症に相当する病態を示す。

8. ウシ型プリオン蛋白質遺伝子発現トランスジェニックマウスを用いた非定型 BSE 感染牛のプリオン体内分布解析

分担研究者 松浦 裕一 農研機構動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域

主任研究員

研究協力者 岩丸 祥史 (農研機構動物衛生研究部門・越境性感染症研究領域)

宮澤 光太郎 (農研機構動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域)

岡田 洋之 (農研機構動物衛生研究部門・病態研究領域)

研究要旨

牛海綿状脳症 (BSE) に実験感染した牛の可食部筋肉にプリオン感染性が認められている。本研究課題では、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因である従来型 C-BSE プリオンとは性質が異なる非定型 H-BSE について感染牛の組織に分布するプリオン感染価を定量的に求め、食肉を介した BSE のヒトへの感染リスクの評価に資する知見を提供することを最終目的とする。本年度は H-BSE プリオンの終末限界希釈法を行い、脳に $10^{7.4}$ LD₅₀/g の感染価が分布すること、ウシプリオン蛋白質発現トランスジェニックマウスの潜伏期間とプリオン感染価の関係 (用量反応標準曲線) を明らかにした。この基準を用いることで、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。

A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は、病態や異常プリオン蛋白質の生化学的性状の違いによって、定型 (C-BSE) と非定型 (L-BSE もしくは H-BSE) に分けられる。3 つともそれぞれ異なるプリオンによる疾病である。C-BSE プリオンは食を介して人に感染し、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因であり、実験的に L-BSE プリオンも人に感染することが示唆される。C-BSE や L-BSE では可食部筋肉から BSE 感染性が検出されたことから、H-BSE についても感染牛の組織に分布するプリオン感染価を定量的に求め、食肉を介した BSE のヒトへの感染リスクの評価に資する知見を提供することを最終目的とする。

本年度は、牛の組織に分布する H-BSE プリオンの感染価を測定する技術、すなわち用量反応標準曲線を算出することを目的とする。

B. 研究方法

1) 終末限界希釈法による H-BSE 感染価の測定

H-BSE 牛の 10%脳乳剤 (3 頭プール: 9458, 0782, 7749) を 10 倍段階希釈して、それぞれをウシ型

PrP 発現トランスジェニック Tg マウスの脳内に投与した。Tg マウスを週 3 回観察し、行動異常やふらつきなどの神経症状が観察された時点で安楽死した。ウエスタンブロット法や免疫組織化学染色で脳に異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が検出された Tg マウスを BSE 感染陽性として、脳内投与後安楽死までの日数 (潜伏期間) を求めた。また、脳内投与後 800 日以上経過したマウスを安楽死して、異常プリオン蛋白質の有無をウエスタンブロット法や免疫組織化学染色で調べた。

H-BSE 感染牛脳乳剤の希釈液ごとに Tg マウスの BSE 感染陽性率を求め、Spearman-Kärber 法を用いて牛脳 1 g あたりの 50%致死量 (LD₅₀/g) を H-BSE プリオン感染価として算出した。

2) H-BSE プリオンの用量反応標準曲線の算出

H-BSE 感染牛脳乳剤の希釈液ごとに H-BSE 感染価の対数 (Y) を求め、GraphPad Prism ver.7.0c for Mac (GraphPad Software, San Diego California USA) で、Curve Fitting の Segmental regression fits 法を用いて、Tg マウスの潜伏期間 (日数) を X とした用量反応標準曲線を算出した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会にて承認され、プリオンの取り扱い、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症実験指針（平成15年10月）」を遵守する。遺伝子改変動物を用いた動物実験は組換え実験委員会ならびに動物実験委員会にて承認され、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月）」を遵守する。

C. 研究結果

1) 終末限界希釈法による H-BSE 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 Tg マウスが 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。

2) H-BSE プリオンの用量反応標準曲線の算出

H-BSE 牛脳の希釈液に相当する感染価の対数 (Y) ごとの Tg マウスの潜伏期間 (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、 $Y_1 = 19.32 + (-0.046) \times X$ ($1 < X \leq 329$) ; $Y_2 = 4.4 + (-0.0054) \times X$ ($329 < X < 800$) と算出された (相関係数 $R^2=0.9676$)。

D. 考察

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。

E. 結論

H-BSE 感染牛 (発症期) の脳には、Tg マウスに対して $10^{7.4}$ LD₅₀/g の感染価があることを明らかにするとともに、Tg マウスを用いた H-BSE プリオンの感染価を測定する基準 (用量反応標準曲線) を樹立した。

F. 健康危険情報

これまでの研究成果で国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

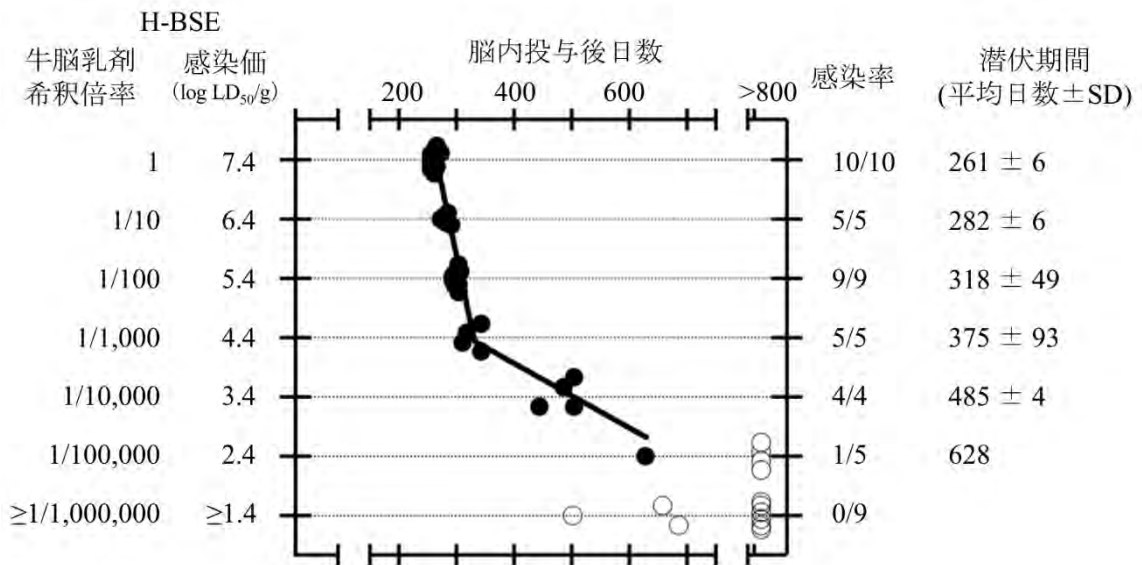


図 Tg マウスへの H-BSE プリオンの感染性

H-BSE 牛脳乳剤の段階希釈液を脳内に投与したのち安楽死までの潜伏期間をプロットした。BSE 感染陽性 Tg マウスを“●”、陰性 Tg マウスを“○”で示し、H-BSE プリオンの用量反応標準曲線を線で表した。

9. 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

分担研究者	森田 幸雄 東京家政大学・家政学部 教授
	壁谷 英則 日本大学・生物資源科学部 准教授
	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 教授
研究協力者	池田 徹也 (北海道立衛生研究所・感染症部)
	堀内 基広 (北海道大学大学院・獣医学研究院)
	中山 達哉 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)
	野市 哲也、茂原 馨 (スターゼンミートプロセッサー株式会社)
	三浦 和行、富田 昌俊 (スターゼン株式会社)
	宇都 菜央、尾崎 正秀、島原 道範 (株式会社大山どり)
	一川 仁美、吉田 梨花、森田 聡志、宮川 明日香 (日本大学・生物資源科学部)

研究要旨

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。これらの施設では HACCP の構築や内部検証の実施は容易であると思われた。HACCP システムの義務化に際しては、導入と畜場・食鳥処理場側の管理者や従業員の HACCP 教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育も必要であると思われた。また、と畜場・食鳥処理場へ欧米や EU で採用しているゼロトレランスの考え方も HACCP 導入時または導入後には採用するべきであると思われた。

平成 29 年度は、わが国において、牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場（牛の処理 2 カ所、豚の処理 2 カ所）、並びに食鳥処理場（2 カ所）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く、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」の検体から検出された。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。

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。

A. 研究目的

現在、わが国では、危害分析重要管理点 (HACCP) による食品の製造または加工における衛生管理体制の構築が図られている。HACCP は食品の衛生管理のための国際標準として地位を確立し、実際に欧米を始め多くの国で HACCP の導入が進んでいる。これに対し、わが国における HACCP 普及率は依然低く、将来的な HACCP による工程管理の義務化を見据えた様々な試みがある。食肉においても、平成 26 年 6 月、と畜場法施行規則を改正し、従来の基準に加え、新たに HACCP を用いて衛生管理を行う場合の基準 (HACCP 導入型基準) を規定することにより、段階的な HACCP の普及が図られている。

より効果的に HACCP を普及させるためには、事業者の意識を改善するための普及啓発が必要である。厚生労働省が都道府県等のと畜・食鳥検査員に対して指導的な立場となる人材の要請を目的とする「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た。

わが国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、国際的協調性を持ちながらかつ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必要がある (図 1)。HACCP 導入による「食肉の安全性の向上」効果を評価するための科学的手法の確立が必須となる。欧米では大腸菌などの衛生指標細菌を用いた HACCP 効果検証方法が確立されているが、施設の規模や処理頭数の異なるわが国のと畜場、ならびに食鳥処理場に即した手法の確立が期待される。本研究は、わが国のと畜場 (牛、豚)、および食鳥処理場 (鶏) を対象として、HACCP 導入時および運用期間におけるその効果の科学的検証方法の確立を目的とする。平成 29 年度では、わが国において、牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場 (牛の処理 2 カ所、豚の処理 2 カ所)、並びに大規模食鳥処理場 (2 カ所) 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 検証プロトコールの候補を比較検討した。特に、採材部位、および採材ポイント、ならびに衛生指標細菌について検討した。

と畜・食鳥処理の工程は多い。と畜場や食鳥処

理場に HACCP を導入する際各行程における危害性微生物に関する情報を分析する必要がある。文献収集とその解説、さらに、導入を計画している施設への適応など、HACCP 導入を困難にしている。欧米では、と畜工程の中に、乳酸やオゾン水を用いて枝肉を殺菌する工程を含めている処理場がある。この行程によって危害性微生物を積極的に減少させ、枝肉の微生物学的な衛生状況を良好にさせる役割を持つ。わが国ではこのような処理が行われていない。以上のことから、本年度は、牛および豚について、各と畜工程ごとの、衛生指標菌の数、また、処理過程における菌数の変化、さらには上述の制御処理の前後の菌数を示している文献を収集し、データベース化、一覧表とした。と畜場への HACCP 導入の支援に用いることができる文献集を構築する。

B. 研究方法

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

厚生労働省は平成 29 年 11 月～平成 30 年 2 月に、北海道・東北ブロック、関東甲信越ブロック、東海・北陸ブロック、近畿ブロック、中国・四国ブロック、九州ブロックので「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」を実施している。また、平成 29 年度食肉衛生技術研修会 (厚生労働省主催)、平成 29 年度微生物部会研修会 (全国食肉衛生検査所協議会主催) 等で使用する資料の一部を作成した。

2) 検査対象施設

わが国の牛、豚をそれぞれ対象とした各 2 カ所のと畜場 (牛: 施設 B1、および B2、豚: 施設 S1、S2)、ならびに大規模食鳥処理場 (C1、C2) を対象とした。各施設の従業員数、ならびに年間処理頭 (羽) 数を表 1 に示す。

3) 採材部位

牛については、3 カ所 (胸部; 以降「胸」、ともばら、および肛門周囲部; 以降「肛門」、豚については、3 カ所 (胸、頸部; 以降「頸」、肛門) とした (図 2、3)。

鶏については、はじめに採取部位間の比較を実施した。すなわち、施設 C2 で処理された 10 羽の鶏について、3 カ所（胸、腹部；以降「腹」、モモ）からそれぞれ採材し、一般細菌数を比較した。以降の調査については、2 カ所（胸、モモ）を採材部位とした（図 4、5）。

4) 採材ポイント

牛、ならびに豚については、2 時点（冷蔵庫搬入前；以降「冷蔵前」、冷蔵保存後約 24 時間；以降「冷蔵後」とした。鶏については、1 時点（チラー処理後）とした。

5) 採材方法

「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に従い、市販のキット（GSI クレオス製「BM フキトレール A」）による綿棒を用いた拭き取りを実施した。拭き取り領域は、牛、および豚では 100cm²、鶏では 25cm²とした。鶏用の拭き取り棒はステンレス板で作製した（図 6）。綿棒が枝肉と平行になるように当て、縦横斜め（計 4 方向）、各方向につき 10 往復させて拭き取りを行った。拭き取り検体は冷蔵（4℃）条件下で日本大学生物資源科学部獣医学科獣医公衆衛生学研究室に運搬し、拭き取り採取後 72 時間以内に下記衛生指標細菌の培養を行った。

6) 調査対象の衛生指標細菌

本研究では、日本において枝肉の微生物検査として、あるいは米国、EU で HACCP 検証方法のいずれかにおいて採用されている 5 種類の衛生指標細菌について検討した。すなわち、一般衛生管理の指標細菌として、一般細菌数（日本、EU）、大腸菌群（日本）、および糞便汚染指標細菌として、大腸菌（米国）、腸内細菌科菌群（日本、EU）、ならびに病原細菌としてサルモネラ属菌（EU）について、それぞれ検討した。

7) 衛生指標細菌数の測定

各検体「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に従い、各指標細菌数を計測した。すなわち、各拭き取り材料 1ml 量を終量 10ml となるように滅菌 PBS に回収し、10 倍階段希釈液を作成した。各検体の 1 ml 量を、各条件につき 2 枚ずつのペトリフィルム（AC プレート：

一般細菌用、EC プレート：大腸菌群/大腸菌用、EB プレート：腸内細菌科菌群用）にそれぞれ接種した。AC プレートは 35℃で 48 時間、EC、および EB プレートは 35℃で 24 時間培養し、それぞれ形成されたコロニー数を計測した。

サルモネラ属菌については、ペトリフィルムサルモネラ属菌測定システムを用いて測定し、添付のプロトコールに従った。すなわち、拭き取り材料 1ml 量を等量（1ml）の 3M サルモネラ属菌用前増菌基礎培地に接種し、41.5℃で 18 時間培養（前増菌培養）後、培養物 0.1ml 量をラパポート・バシリアディス R10 プロス（R-V R10）10.0ml に加え、41.5℃、24 時間培養（選択増菌培養）した。培養後、SALX プレートに塗抹し、41.5℃で 24 時間した。さらに、選択増菌した後の培養物について、DHL、MLCB 寒天培地にも併せて接種し、37℃で 24 時間培養した。

8) 統計解析

拭き取り部位の比較では、Friedman 検定、並びに Wilcoxon 順位和検定により行った。採材ポイント、ならびに施設間比較には、Mann-Whitney U 検定により行った。本研究では、検出限界未満、および検出限界超となった検体については、それぞれ 0 cfu/cm²、および 25,000(<) cfu/cm²として扱った。

9) 牛および豚のと畜処理工程における微生物汚染状況文献調査

文献データベースは、Scopus（エルゼビア）および JDreamIII（株式会社ジー・サーチ）を用いた。HACCP 工程の全般を対象とした。また「abattoir、slaughter、carcass、ligat、eviscerat、hide、trim、wash、decontaminat、cool、chill、refrigirat」をキーワードとした。それらを適宜に組み合わせ、日本、米国、カナダ、欧州（英国、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン）を対象として文献を収集した。1990 年以降を調査期間とした。

欧文論文は和訳後の要点について、邦文論文はその要点について、各文献の個票を作製した。食道結紮、肛門結紮、剥皮、内臓摘出、トリミング、洗浄・殺菌、冷却、冷蔵・保管」等の処理工程を項目として各文献を整理し、一覧表を作成した。

個票に基づき、各文献の重要点を抽出し、一覧表を作製した。その際、一覧表に記載した抽出部

分が視覚的にわかるよう、個票を作製した。
調査は東レリサーチセンターに依頼した。

C. 研究結果

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」等に使用する資料の一部について掲載する (図 7)。

スライド 1 : 我が国では検証という言葉が Validation、Verification、Audit で使用されている。と畜検査員・食鳥検査員は Audit (監査) の立場として、HACCP に参加するものである。

スライド 2 : と畜場、食鳥処理場はコーデックス HACCP の 7 原則 (12 手順) を実践し、その内容を踏まえた上で、衛生管理計画を作成する基準 A である。よって、HACCP 導入については HACCP を熟知したスタッフがと畜場、食鳥処理場に存在することが必要。

スライド 3 : 加熱工程のないと畜場、食鳥処理場の HACCP はリコールプログラムを備えた一般衛生管理が最も重要である。

スライド 4 : と畜場では一般衛生管理を確実に実施することで微生物制御の効果が上がる。HACCP は衛生度を保証するものである。

スライド 5 : 米国食品安全検査局 (FSIS) では腸管出血性大腸菌 (EHEC) の汚染は「喉差し」、「剥皮」、「肛門結紮」、「内臓摘出」の工程で頻繁するので、注意が必要であるとしている。よって、これらの工程を一般衛生管理や重要管理点 (CCP) によって管理する必要がある。

スライド 6 : 対米輸出、対 EU 輸出認定にあってはこれらの手洗いや前掛け消毒装置が必要であり、獣毛を含む汚物を発見しやすくするためにスポットライトで照度を上げている。

スライド 7 : 施設の一般衛生管理として床と壁の境界は掃除がしやすいように R 構造とすることやホースはホースラックへかけること等を実施しなければならない。

スライド 8 : 米国や EU 諸国等とはと畜場、食鳥処理場では HACCP システムは導入済みであり、次のステップとしてゼロトレランスが実施されている。

スライド 9 : と畜検査員・食鳥検査員のゼロトレ

ランスの実施は枝肉検査時での全頭検査および最終洗浄前の枝肉の抽出検査である。

2) 牛処理施設の細菌数

2-1) 拭き取り部位の比較

施設 B1、および B2 でそれぞれ冷蔵前 (図 8)、および冷蔵後 (図 9) に、肛門、ともばら、胸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 B1 で採取した冷蔵前の検体の中央値は、肛門で 8.6×10^1 cfu/cm²、ともばらで 1.3×10^2 cfu/cm²、胸で 7.8×10^1 cfu/cm² で、何れも、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、冷蔵前の検体においては、肛門で 4.1 cfu/cm²、ともばらで 1.9×10^1 cfu/cm²、胸で 7.5 cfu/cm² で、ともばらは、肛門、胸に比べ、有意 (それぞれ $p < 0.005$ 、 $p < 0.05$) に高い値を示した。

一方、冷蔵後では、施設 B1 では、肛門で 9.0 cfu/cm²、ともばらで 1.5×10^1 cfu/cm²、胸で 9.0 cfu/cm²、施設 B2 では、肛門で検出限界未満、ともばらで 2.9 cfu/cm²、胸で検出限界未満で、いずれも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

施設 B1、および B2 でそれぞれ採取した、胸、ともばら、肛門全ての検体の一般細菌数を、それぞれ採取したポイント毎に比較した (図 10)。その結果、施設 B1 で採取された検体の中央値は、冷蔵前で 8.7×10 cfu/cm²、冷蔵後で 1.4×10^1 cfu/cm²、施設 B2 の検体の中央値は、冷蔵前で 7.5 cfu/cm²、冷蔵後で検出限界未満となり、両施設において、何れも冷蔵前の検体で有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。

2-3) 施設間の比較

冷蔵前、および冷蔵後に施設 B1 および同 B2 でそれぞれ採取した、胸、ともばら、肛門、全ての検体の一般細菌数を、施設毎に比較した (図 11)。その結果、冷蔵前に採取された検体の中央値は、施設 B1 で 8.7×10^1 cfu/cm²、同 B2 で 7.5 cfu/cm²、冷蔵後では、施設 B1 で 1.4×10^1 個/cm²、同 B2 で検出限界未満となり、冷蔵前、および冷蔵後、何れにおいても、施設 B1 の検体で有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。

冷蔵前のともばらの検体についてのみ、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 ($p < 0.01$) に高い値を示した (図 1 2)。

2-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

本研究で検討した検体のうち、施設 B2 で採取されたものは、大腸菌群を含め、何れの糞便汚染指標細菌も検出されなかった (表 2)。

一方、施設 B1 で採取された 90 検体のうち、4 検体 (4.4%) から腸内細菌科菌群が検出された。これらは全て冷蔵前に採取されたものであり、肛門、ともばらが各 2 検体であった。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

施設 S1 および同 S2 でそれぞれ冷蔵前 (図 1 3)、および冷蔵後 (図 1 4) に、肛門、胸、頸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、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 4.5 cfu/cm²、胸で 5.8×10^1 cfu/cm²、頸で 6.2×10^1 cfu/cm² で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。一方、施設 S2 では、肛門で 3.9 cfu/cm²、胸で 3.0×10^1 cfu/cm²、頸で 2.1×10^1 cfu/cm² で、胸は、肛門に比べ、有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。

冷蔵後では、施設 S1 では、肛門で検出限界未満、胸で 1.2×10^1 cfu/cm²、頸で 2.5×10^1 cfu/cm² で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意 (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.005$) に高い値を示した。

3-2) 採材ポイントの比較

施設 S1、および同 S2 でそれぞれ採取した、胸、頸、肛門全ての検体の一般細菌数を、それぞれ採取したポイント毎に比較した (図 1 5)。その結果、施設 S1 で採取された検体の中央値は、冷蔵前で 3.8×10^1 cfu/cm²、冷蔵後で 8.4 cfu/cm² で、冷蔵前の検体で有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。一方、施設 S2 では、冷蔵前で 1.5×10^1 cfu/cm²、冷蔵後で検出限界未満となり、冷蔵前の検体で有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。

3-3) 施設間の比較

冷蔵前、および冷蔵後に施設 S1、および同 S2 でそれぞれ採取した、胸、頸、肛門全ての検体の一般細菌数を、施設毎に比較した (図 1 6)。その結果、冷蔵前に採取した検体の中央値は、施設 S1 で 3.8×10^1 cfu/cm²、同 S2 で 1.5×10^1 cfu/cm² であった。冷蔵後では、施設 S1 で 8.4 cfu/cm²、同 S2 で検出限界未満で、冷蔵前は冷蔵後に比べ、有意 ($p < 0.001$) に高い値を示した。

同様に、冷蔵前の胸、頸の検体についてのみ、施設間比較を行ったところ、施設間で有意差は認められなかった (結果は示さず)。

3-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

本研究で検討した検体のうち、施設 S1、および同 S2 で採取されたもののうち、それぞれ 2 (2.2%)、および 2 (3.3%) 検体から腸内細菌科菌群が検出された (表 3)。このうち 1 検体は冷蔵後の頸から採取したものであったが、他は全て冷蔵前に採取された胸であった。

全ての検体において、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) からそれぞれ採材し、一般細菌数を比較した (表 4)。その結果、平均値、中央値の順に、胸で 1.2×10^4 cfu/cm²、 4.9×10^3 cfu/cm²、腹で 8.2×10^3 cfu/cm²、 5.6×10^3 cfu/cm²、モモで 6.8×10^3 cfu/cm²、 5.3×10^3 cfu/cm² であった。

4-2) 拭き取り部位の比較

施設 C1、および同 C2 でそれぞれチラー後に、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 (図 1 7)。その結果、施設 C1 で採取した検体の中央値は、胸で 2.3×10^2 cfu/cm²、モモで 2.2×10^2 cfu/cm² で、拭き取り部位間で有意差は認められなかった。一方、施設 C2 では、胸で 3.7×10^2 cfu/cm²、モモで 8.2×10^2 cfu/cm² で、モモは胸に比べ、有意 ($p < 0.01$) に高い値を示した。

4-3) 施設間の比較

施設 C1、および同 C2 でそれぞれ採取した、胸、モモ全ての検体の一般細菌数を、施設毎に比較した (図 1 8)。その結果、施設 C1 で採取した検体

の中央値は、 2.2×10^2 cfu/cm²、同 C2 で 4.4×10^2 cfu/cm² で、施設 C2 は、同 C1 に比べ、有意 ($p < 0.01$) 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、および同 C2 で採取されたものでは、それぞれ 16 検体 (53.3%)、および 20 検体 (66.6%) から検出された (表 5)。

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。大腸菌群のみ検出されたものは 1 検体 (3.3%) であった。

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

4-5) 衛生指標細菌間の相関関係

糞便汚染指標細菌間での関連性としては、大腸菌群、および大腸菌が検出された検体は、全て腸内細菌科菌群陽性であった。*Salmonella* の検出された検体は、腸内細菌科菌群は検出されたが、大腸菌群、および大腸菌は検出されなかった (表 5)。

腸内細菌科菌群数と、一般細菌数の相関性を検討したところ、それぞれの相関係数 (ピアソン相関) は胸では、 $r=0.556$ 、モモでは、 $r=0.452$ で、弱い相関性が認められた (図 19)。

5) 牛および豚のと畜処理工程における衛生微生物分布状況に関する文献調査

米国オハイオ大学が公表している Supporting Documentation Materials for HACCP Decisions (<https://meatsci.osu.edu/programs/food-safety/resources/haccp/documentation-materials>) を入手し、本資料の Beef and Pork Slaughter Process のリストに掲載されている文献より選定した 34 報 (表 6) について、論文原報を入手し、概要を日本語でとりまとめた。

文献データベース (JDreamIII) を検索し、日本語文献の情報を収集した。各文献の抄録をもとに選定した文献の原報を入手して内容を確認し、最終的に 16 報 (表 7) について概要をとりまとめた。

英語文献については和訳後、各文献が対象としていると畜場 HACCP 中の工程、対象動物、微生物制御のためのパラメータを付していった (表 8)。

当該キーワードにヒットした文献で、取り上げるべき内容を持つ論文は、牛で 25 報、豚で 19 報だった (表 9)。

文献検索中、有効な食肉処理工程は、「トリミング (汚染物除去)」、「移送」、「枝肉洗浄」、「消毒・殺菌」、「消毒洗浄」、「洗浄 (機)」、「全行程」、「湯はぎ」、「内臓摘出」、「剥皮群」、「冷蔵群」に分類された (表 10)。これらの項目の中で、最も文献数が多かったのは「枝肉洗浄」で、全 44 報のうち、16 報を占めていた。次は「冷蔵群」の 9 報、さらに「剥皮群」の 6 報だった。

本文献調査は、牛・豚のと畜処理工程における有効な制御処置に関しても情報収集できている。表 11 は、枝肉に対しての処置を示す。付着細菌を減少させる処置は、主に海外で研究されていた。付着細菌を軽減するのは、薬剤噴霧処置で、具体的な薬剤は、「乳酸」「オゾン水」「過酸化水素」「酢酸」「次亜塩素酸等の塩素系薬剤」「熱水」「フマル酸」「リン酸三ナトリウム」「クエン酸」「リン酸活性化酸性化亜塩素酸ナトリウム」「クエン酸活性化次亜塩素酸ナトリウム」に分類された。全 44 報のうち、「酢酸」を用いている報告が最も多く、10 報を占めていた。「リン酸三ナトリウム」が 5 報、「塩素系薬剤」が続いた。リン酸あるいはクエン酸活性化亜塩素酸ナトリウムも塩素系薬剤になるが、別に分類した。

個票および一覧表を添付資料とした。

D. 考察

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 導入にあっては、と畜場・食鳥処理場側の従業員の教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育が必要である。また、加熱工程のない食肉、食鳥肉の加工・製造では、CCP のモニタリングが目視判定になることが多いことから、明確な基準がなく、HACCP を実施している施設管理者だけでなく検査員も困惑していることが多い。と畜場・食鳥処理場の HACCP システムは一般衛生管理重視でコントロールすべきであることを啓発する必要があると思われた。また、欧米や EU で採用しているゼロトランスも HACCP 導入後には採用するべきであると思われた。

2) 牛、豚、鶏と体の衛生指標菌数

2-1) 牛処理施設

本研究において、採材部位ならびに採材ポイントについて検討した。これらの条件の設定には、より多くの一般細菌数が認められた条件を候補とすることとした。

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、および胸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。このため、本研究で検討した採材部位のうち、ともばらから最も多くの一般細菌を検出できるものと考えられた。

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、採材ポイントは、冷蔵前とすることとした。

以上から、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

一方、検討した糞便汚染指標細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）のうち、最も多くの検体が検出されたのは、腸内細菌科菌群であった。これらは、何れも冷蔵前の拭き取り検体からのみ検出されたこと、さらには肛門と、ともばらから同頻度で検出されたことから、牛における糞便汚染指標細菌の検討には、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」からふきとりを行い、腸内細菌科菌群を指標菌とすることで、最も感度良く、糞便汚染を検出できるものと考えられた。また、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。

施設間比較において、施設 B1、ならびに同 B2 で採材された検体を比較したところ、施設 B1 は同 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 はゼロトランス（「わずかな不具合も見逃さず、不良品を徹底的に排除すること」で、と畜検査員は糞便、消化管内容物および乳房内容物が枝肉に付着していないことを目視検査し、汚染が認められた場合は、と畜検査員の監督下で汚染された部位を迅速に除去させ、汚染の無い枝肉を生

産させること）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。

2-2) 豚処理施設

本研究において、採材部位ならびに採材ポイントについて検討した。これらの条件の設定には、より多くの一般細菌数が認められた条件を候補とすることとした。

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 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ることが明らかとなった。このため、本研究で検討した採材部位のうち、胸、あるいは頸が、より多くの一般細菌を検出できるものと考えられた。

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、採材ポイントは、冷蔵前とすることとした。

以上から、豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

一方、検討した糞便汚染指標細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）のうち、腸内細菌科菌群のみが検出された。これらは、1 検体を除き何れも冷蔵前に胸を拭き取った検体であったことから、豚における糞便汚染指標細菌の検討には、「冷蔵前」に「胸」からふきとりを行い、腸内細菌科菌群を指標菌とすることで、最も感度良く、糞便汚染を検出できるものと考えられた。また、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 S1、ならびに同 S2 で採材された検体を比較したところ、冷蔵前の検体では、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、腸内細菌科菌群は、各施設から、2 検体ずつ検出された。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。実際に、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。これらのことから、本研究においても、両施設は同様な衛生度を示したものと推定された。

2-3) 鶏処理施設

本研究において、採材部位の設定には、より多くの一般細菌数が認められた条件を候補とすることとした。

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。実際に、施設C1、および同C2で採材された検体について、施設C2では、胸とモモを比較した結果、モモで多くの一般細菌が検出された。

以上から、鶏では、「胸」および「モモ」を採材することと設定した。この条件にて、施設C1、ならびに同C2で採材された検体を比較したところ、モモでは、施設C2は同C1に比べて多くの一般細菌数が検出された。施設C1、同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。今後、両施設における一連の作業工程を比較することにより、一般細菌の汚染に関わる要因について検討する必要がある。

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た。

また、一般細菌数と腸内細菌科菌群数の間には

弱い相関性が認められた。鶏は、チラー水等により、と体全体が同様に細菌に汚染されるものと考えられる。このため、一般細菌と腸内細菌科菌群数の間にも相関性が認められたものと考えられる。これに対して、牛や豚は、作業工程、ならびに作業そのものにより、それぞれ糞便による汚染、あるいは環境からの汚染が異なる頻度で発生することが予想される。今後、牛や豚についても一般細菌数と腸内細菌科菌群数の相関性を検討する必要がある。

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。

平成30年度では、以上の成績について、より検体数を増やし、統計学的な解析をすることにより、各条件等を改めて検討した後、設定された検証方法を実際にわが国のさまざまな規模のと畜場、ならびに食鳥処理場で検証することを計画している。

3) と畜場への HACCP 導入を促進するための文献情報

と畜場および食鳥処理場への HACCP 導入を遅延させる原因の一つに、と畜処理工程における危害要因とその危害性の強さ、危害を減少制御するための処置についての情報収集とその整理、活用が難しいこと、そのために多大の手間暇がかかることがあげられる。この対応に基づき、HACCP 導入を計画する施設は CCP の設定を行う。本年度は、牛および豚のと畜処理工程に関わる微生物汚染

状況、その対策について文献収集し、欧文論文は和訳ののち文献個票を作製した。それらをと畜処理工程ごとに区分した一覧表を作成した。

今回の文献調査結果の特徴に、汚染している細菌種と菌数が読み取り易くなっていること、工程内で実施している各種の処置の前後における菌数の変化が明瞭になっていること、さらに、わが国では実施例が少ない、乳酸、酢酸、オゾン水等の殺菌液処理の成績が充実していることがあげられる。これらの特徴はと畜処理工程における CCP 設定に有効に作用すると考える。

本年度にまとめた文献情報は、本研究報告に添付するとともに、今後厚生労働省が実施する各種の研修会に資料として配布する。次年度は食鳥処理工程について、同様の調査を実施する予定である。

E. 結論

と畜場および食鳥処理場への HACCP システムの義務化に際しては、導入と畜場・食鳥処理場側の管理者や従業員の HACCP 教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育も必要であると思われた。

わ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必要がある。その検証システムが整備されている EU および米国の情報を提供し、検証システムの重要性をと畜・食鳥検査員に向かっての研修会資料を作製した。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。これらの衛生検査スタッフを備えた施設では HACCP の構築や内部検証の実施は容易であると思われた。また、欧米や EU で採用しているゼロトレランスの考え方も HACCP 導入時または導入後には採用するべきであると思われた。

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。

鶏では、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。HACCP 導入を計画する各と畜場施設が、それぞれの施設における CCP の効率よい設定に役立てるため、本情報の利用が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 森田幸雄：2017 年 5 月，食肉処理施設における HACCP 導入による輸出促進の後押し—ハード面の施設とソフト面の構築の重要性—，畜産コンサルタント，53(5)，42-47.

2. 学会発表等

1) 森田幸雄：と畜場における HACCP 導入時のポイント および食肉・野生動物における最近の話題、東京都公衆衛生獣医師協議会主催、講演会、平成 29 年 7 月 7 日（東京都港区港南、食肉市場センタービル）

2) 森田幸雄：HACCP 手法導入による衛生管理について、（公）日本食肉市場卸売協会主催、経営トップセミナー、平成 29 年 7 月 26 日（東京都千代田区神田駿河台、中央大学駿河台記念館）

3) 森田幸雄：HACCP の基本と衛生管理で重要なこと、千葉県食肉流通協議会主催、HACCP 講習会、8 月 31 日（千葉県旭市、千葉県立東部図書館研修室）

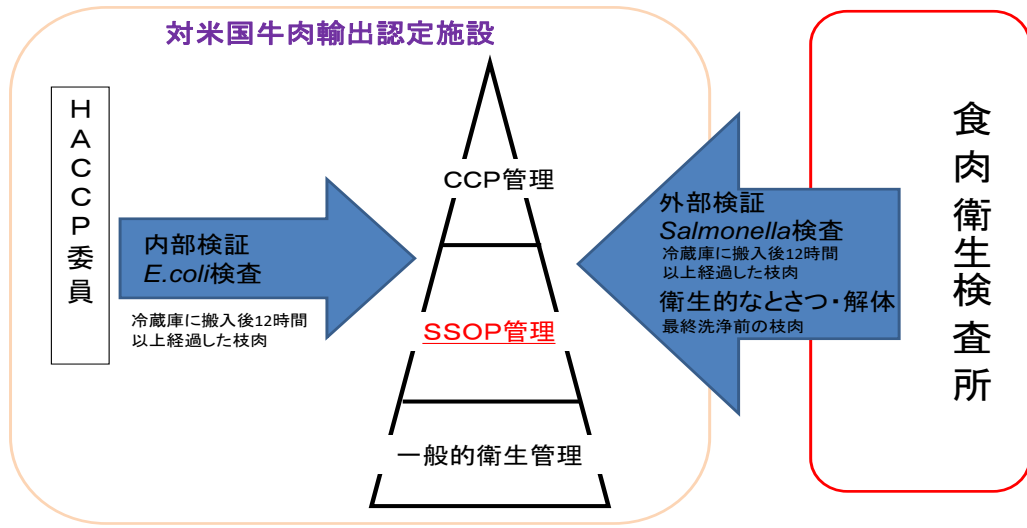
4) 森田幸雄：大規模食鳥処理場における微生物制御、一般社団法人岩手県獣医師会主催、第 4 回食鳥肉安全性確保研修会、平成 29 年 9 月 7-8

日（岩手県八幡平市、八幡平ハイツ）

- 5) 森田幸雄: HACCP 導入における指導・検証の平準化・総括、厚生労働省主催、HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会、平成 29 年 11 月 15-16 日（東京都港区港南、東京都芝浦食肉衛生検査所）平成 30 年 2 月 1-2 日（名古屋市港区、名古屋市食肉衛生検査所）、平成 30 年 2 月 22-23 日（兵庫県姫路市、姫路市食肉衛生検査センター）
- 6) 森田幸雄: 微生物学的制御からみた HACCP 導入時のポイント及び食肉・野生獣肉における話題、全国食肉検査所協議会微生物部会主催、平成 29 年度微生物部会研修会、平成 29 年 11 月 29 日（横浜市中区桜木町、横浜市健康福祉総合センター）
- 7) 森田幸雄: と畜場の HACCP について（米国の STEC 対策を中心に）、厚生労働省主催、平成 29 年度食肉衛生技術研修会、平成 30 年 1 月 22 日（東京都中央区日本橋茅場町、東京証券会館 8 階ホール）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし



EU

内部検証: 一般生菌数、腸内細菌科菌群、*Salmonella*
冷蔵庫に搬入される前の枝肉

USA

外部検証: 衛生的なとさつ・解体
最終洗浄前の枝肉

図1 米国・EU 食肉輸出施設における内部検証と外部検証

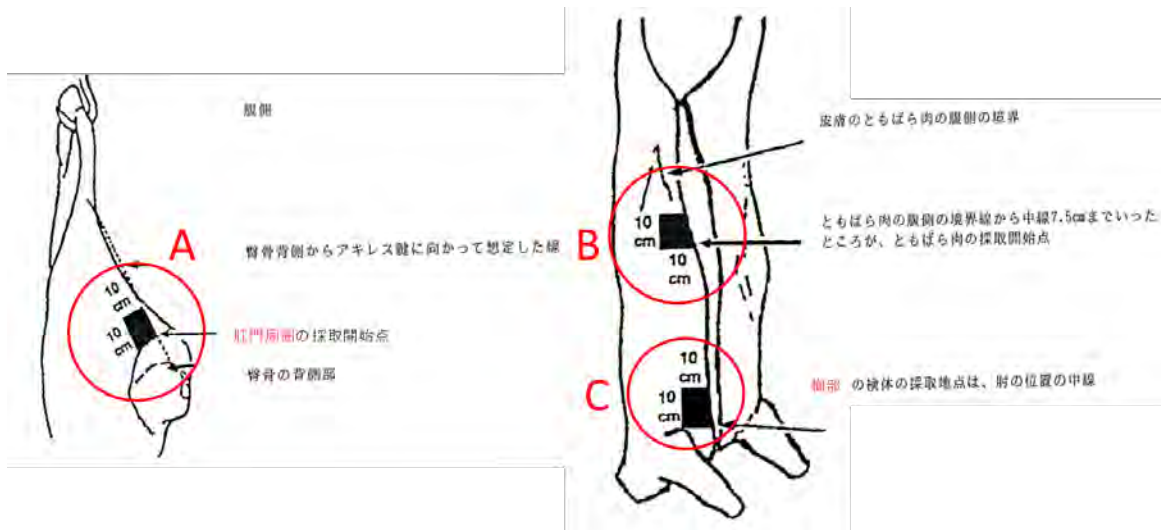


図2 牛の採材部位

○の肛門周囲 (A)、ともばら (B)、胸部 (C) (10cm×10cm) を採取。

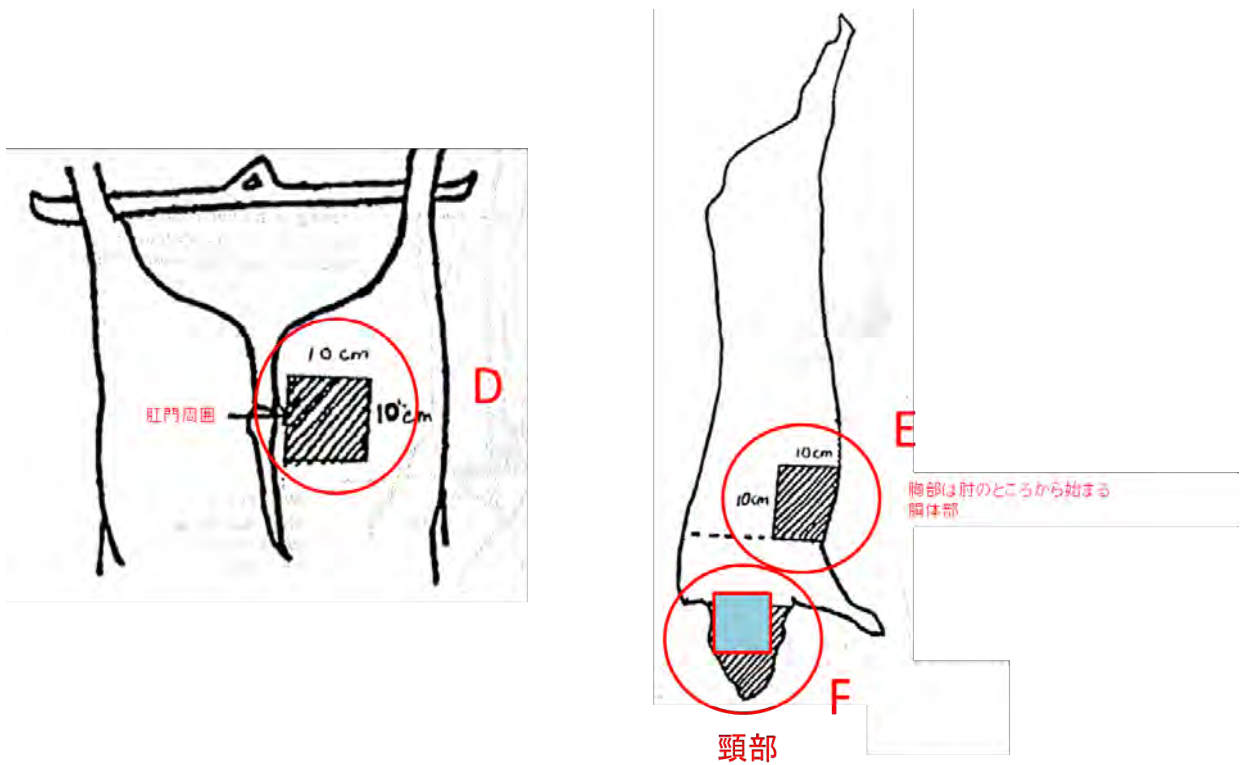


図3 豚の採材部位

○の肛門周囲 (D)、胸部 (E)、頸部 (F) (10cm×10cm) を採取。

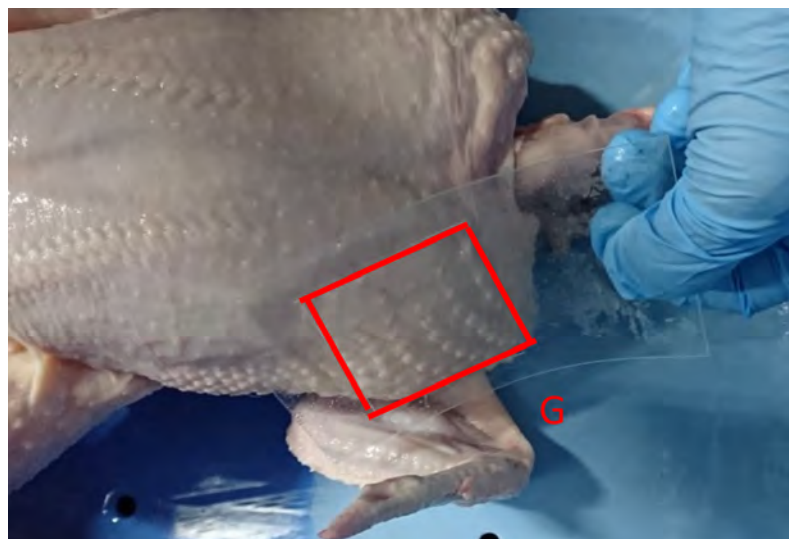


図4-1 鶏の採材部位

□の胸部 (G) (5cm×5cm) を採取。写真ではビニール枠ですが、実際は滅菌ステンレス板 (図4-3) で実施。

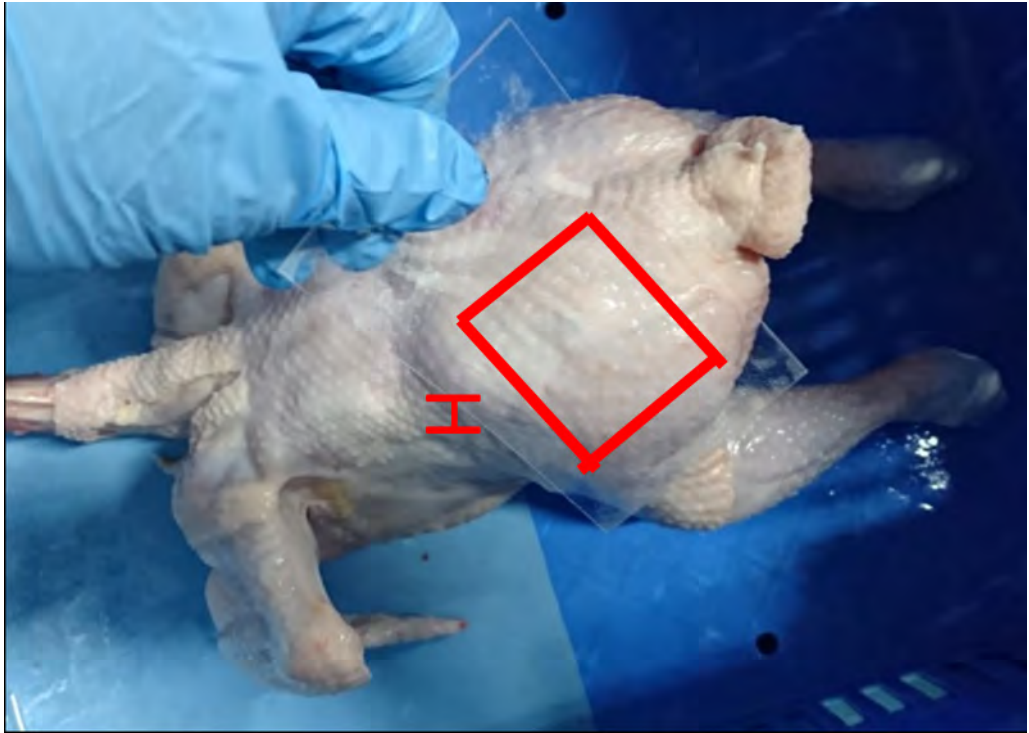


図5 鶏の採材部位

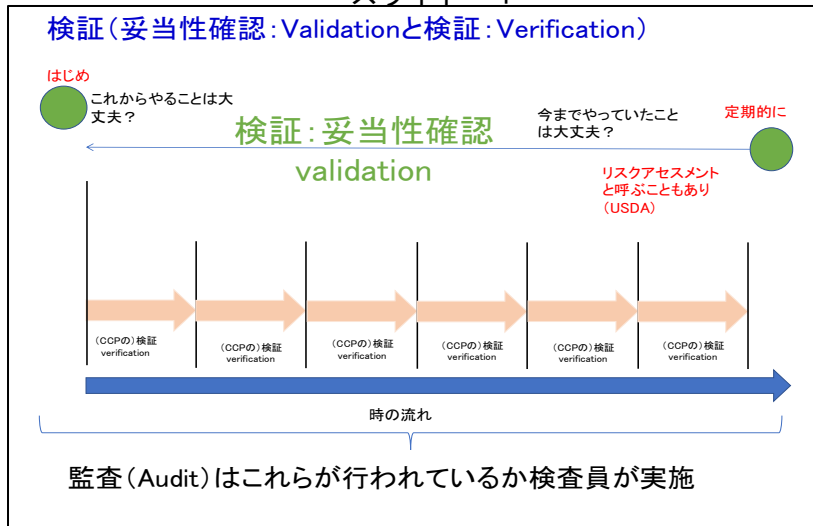
□のモモ部 (H) (5 cm×5 cm) を採取。写真ではビニール枠ですが、実際は滅菌ステンレス板 (図4-3) で実施。



図6 鶏用拭き取り枠

ステンレス板で 5 cm×5 cm を作製した。

スライド 1



スライド 2

基準 A
 コーデックス HACCP の7 原則(12 手順)を実践し、その内容を踏まえた上で、衛生管理計画を作成

一般衛生管理の内容

- 施設・設備の衛生管理
- 使用水の管理
- そ族・昆虫対策
- 廃棄物・排水の取扱い
- 食品等の取扱い
- 回収・廃棄
- 情報の提供
- 食品取扱者の衛生管理・教育訓練等

必要な手順書等も作成

基準 B
 一般衛生管理を基本とし、必要に応じて重要管理点を設けて管理する、**HACCP の考え方に基づく衛生管理**を行う

対象業種 :

小規模事業者
 当該店舗での小売販売のみを目的とした製造・加工・調理施設
 例)菓子製造販売業、食肉販売業、魚介類販売業、豆腐製造販売業、弁当調理販売業等
 提供する食品の種類が多く、変更頻度が頻繁な業種
 例)飲食店、給食施設、そうざい製造業、弁当製造業等

一般衛生管理による管理で対応が可能な業種
 例)包装食品の販売業、食品の保管業、食品の運搬業等

スライド 3

HACCPシステムの導入

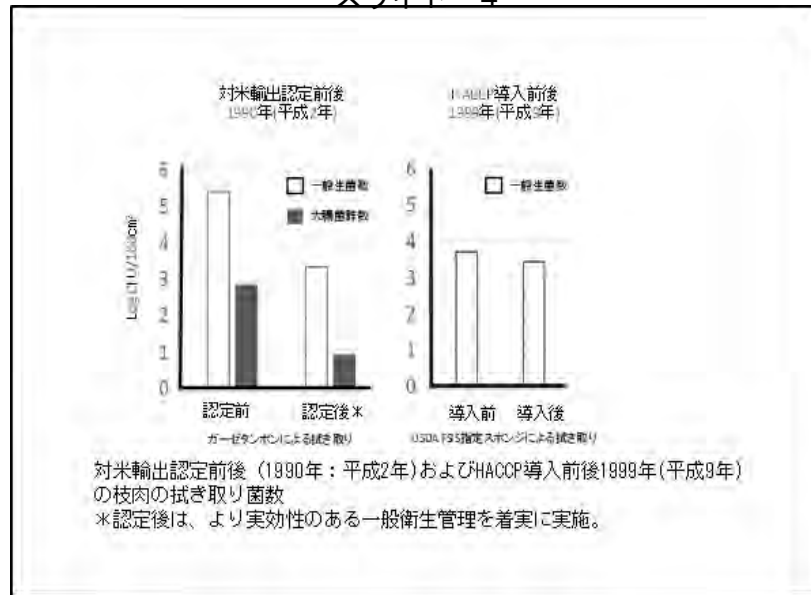
HACCPによる管理
 各製造工程ごとに生物、物理、化学的なハザードを考える(HA)。HAを管理するための重要管理点(CCP)をみつける。そのCCPをしっかり管理して記録する。

一般衛生管理＝前提条件プログラム
 5S活動:「整理」、「整頓」、「清掃」、「清潔」、「習慣」
 製造環境の衛生管理
 施設、器具・機材は清潔に、ネズミやハエが入り込まないように、排水・廃棄物は食品と接触しないようにして、すみやかに外へ、飲用適な水の確認など
 食品の衛生的な取り扱い
 衛生的な原材料を仕入れる、二次汚染しないように(作業員から、施設・器具・機材から)
 従業員衛生管理、従業員教育・訓練、記録

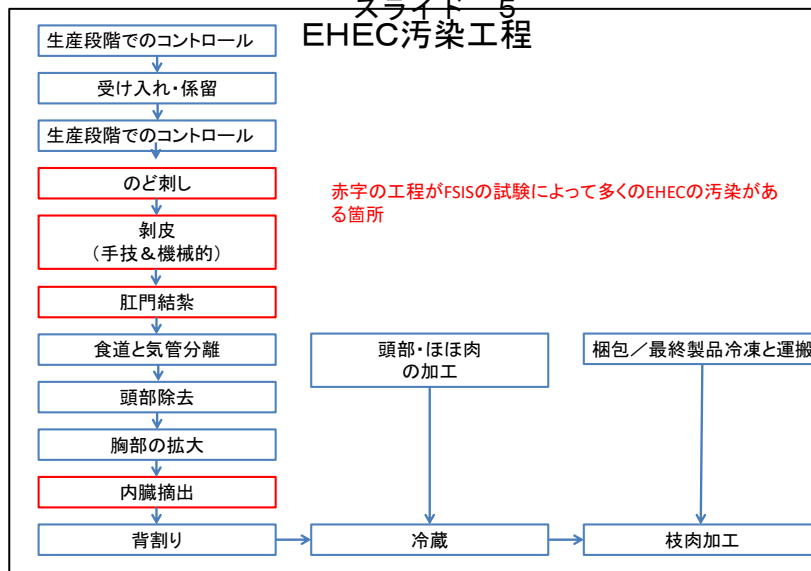
**危機管理
 リコールプログラム**

図7 「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一部を掲載

スライド 4



スライド 5
EHEC汚染工程



スライド 6

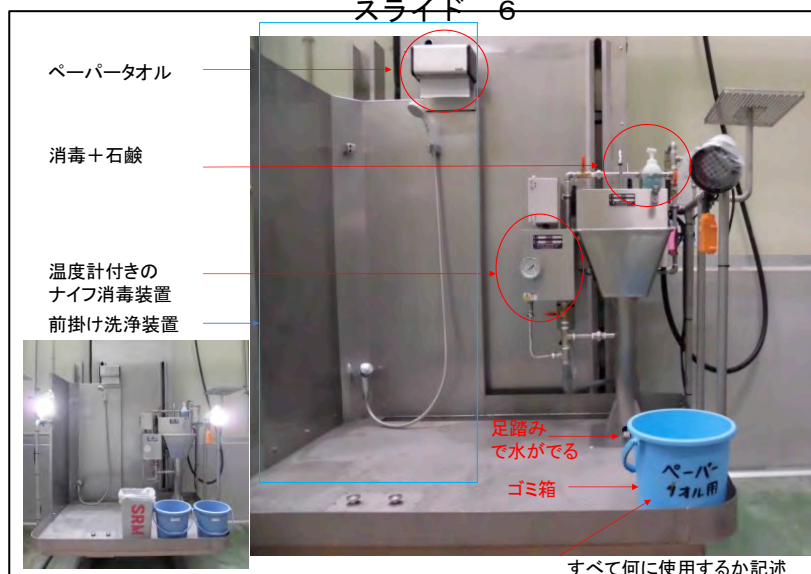


図7 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の一部を掲載



ゼロトレランス(米国やEUで導入)

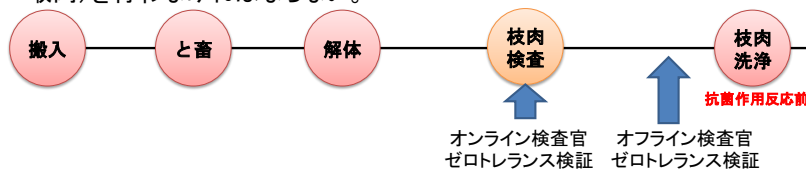
ゼロトレランスの本来の意味は「わずかな不具合も見逃さず、不良品を徹底的に排除すること」
(米国の教育現場から現れた発想)



と畜検査員は糞便、消化管内容物および乳房内容物が枝肉に付着していないことを目視検査し、汚染が認められた場合は、と畜検査員の監督下で汚染された部位を迅速に除去させ、汚染の無い枝肉を生産させること。

オフライン検査員による枝肉ゼロトレランス検証

・ 少なくとも、と畜シフト毎に1回はゼロトレランス検証(枝肉、頭、頬肉、喉肉)を行わなければならない。

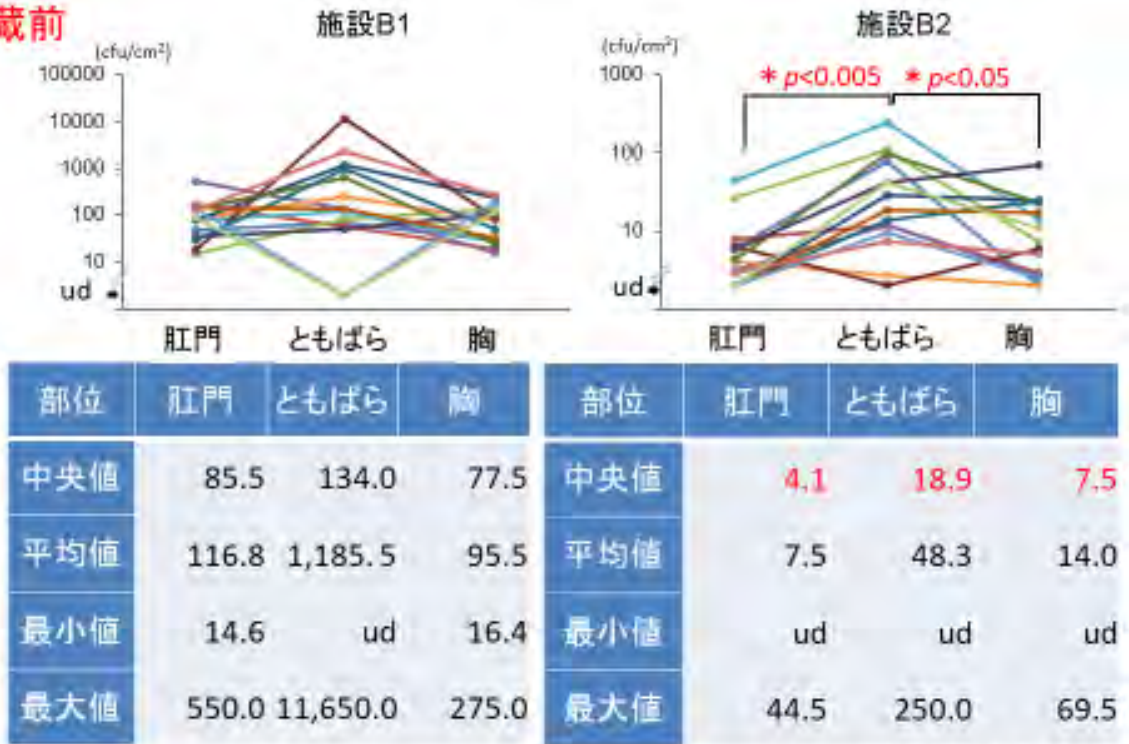


Slaughter Volume (# of animals per day)	# of Carcass Units (1 Unit = whole carcass)	# of Sides
100 or less	2	4
101 to 250	4	8
251 to 500	7	14
More than 500	11	22

Note: For each zero tolerance task performed, it is not necessary to examine all of these units at the same time.

図7 「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一部を掲載

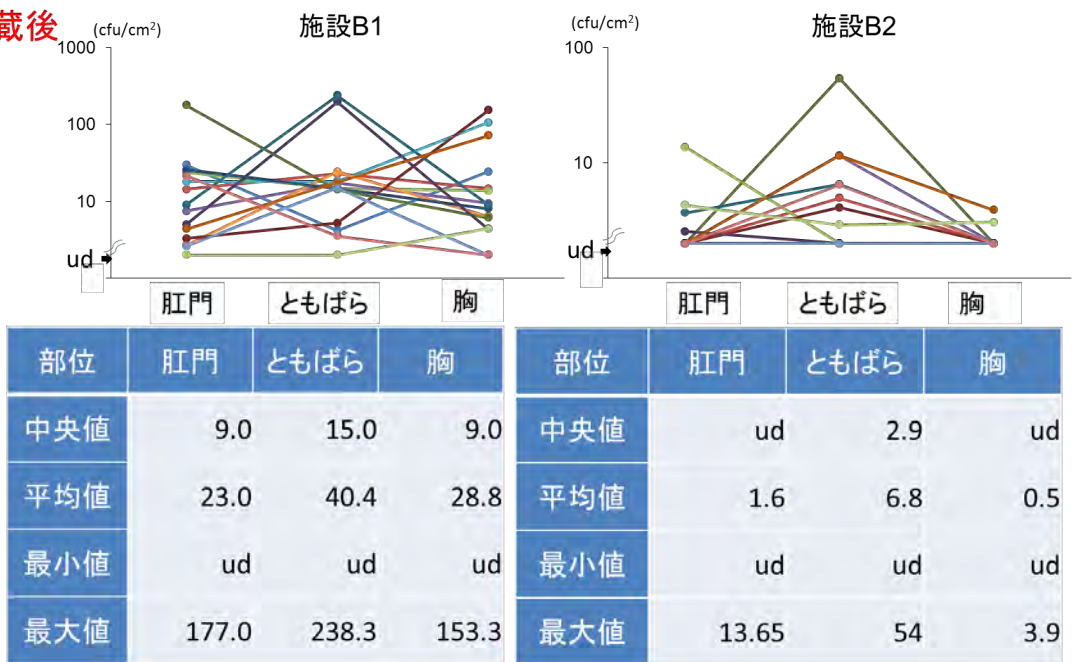
冷蔵前



ud: 検出限界未満

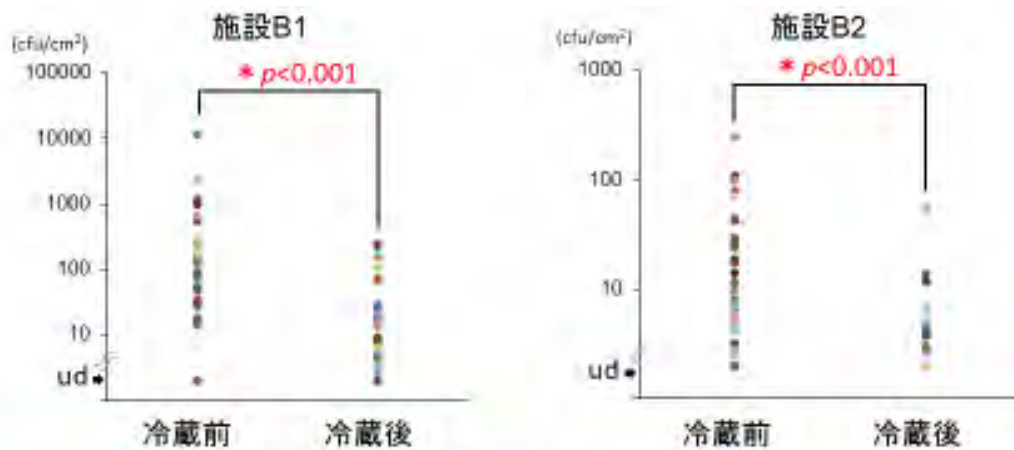
図8 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 牛

冷蔵後



(cfu/cm²) ud: 検出限界未満

図9 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 牛

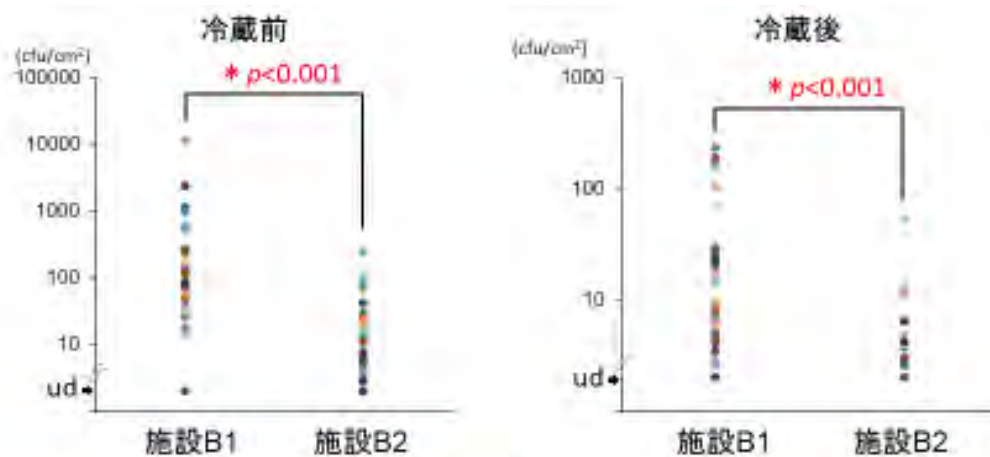


採材ポイント	冷蔵前	冷蔵後
中央値	87.0	14.3
平均値	465.9	30.7
最小値	ud	ud
最大値	11,650	238.3

採材ポイント	冷蔵前	冷蔵後
中央値	7.5	ud
平均値	23.3	3.0
最小値	ud	ud
最大値	250.0	54.0

ud: 検出限界未満

図10 一般細菌数 | 採材ポイントの比較 | 牛



施設	B1	B2
中央値	87.0	7.5
平均値	465.9	23.3
最小値	ud	ud
最大値	11,650.0	250.0

施設	B1	B2
中央値	14.3	ud
平均値	30.7	3.0
最小値	ud	ud
最大値	238.3	54.0

ud: 検出限界未満

図11 一般細菌数 | 施設間の比較 | 牛

- 部位 : ともばら
- タイミング : 洗浄後
- 有意差検定 : Mann-Whitney U検定



図12 牛設定条件による一般細菌数の施設間の比較



図13 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 豚



図14 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 豚



図15 一般細菌数 | 採材ポイントの比較 | 豚

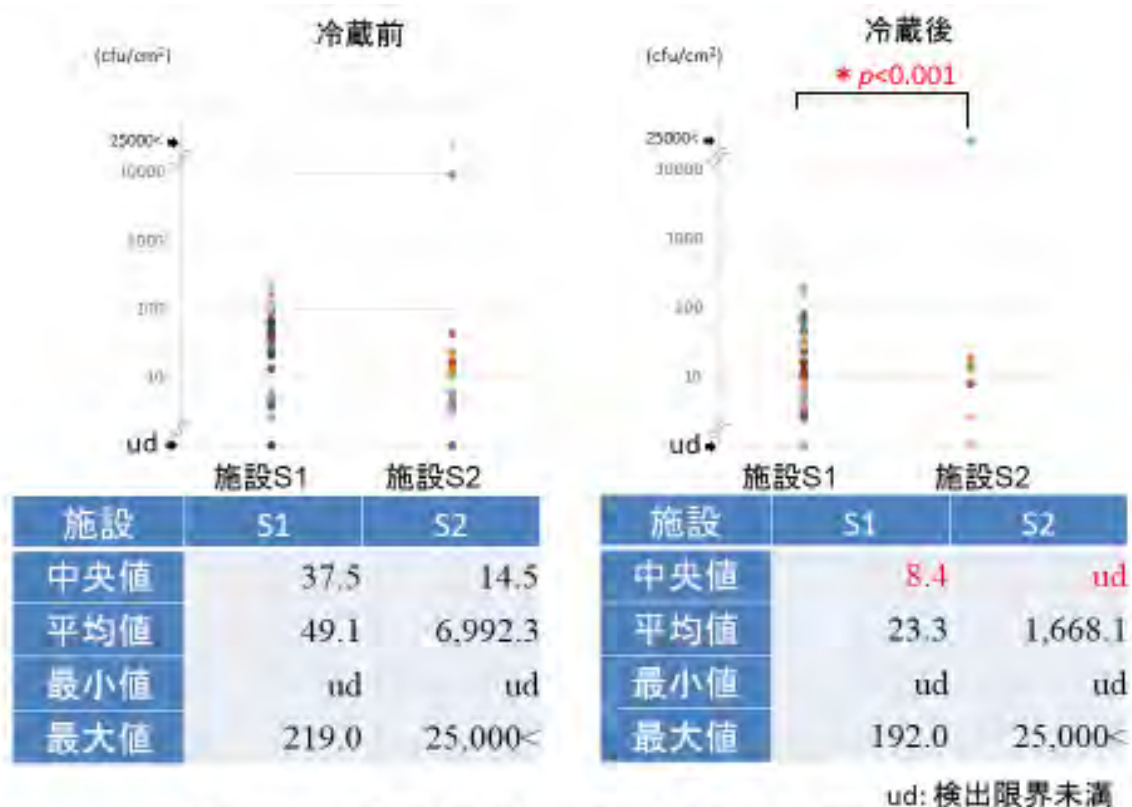


図16 一般細菌数 | 施設間の比較 | 豚

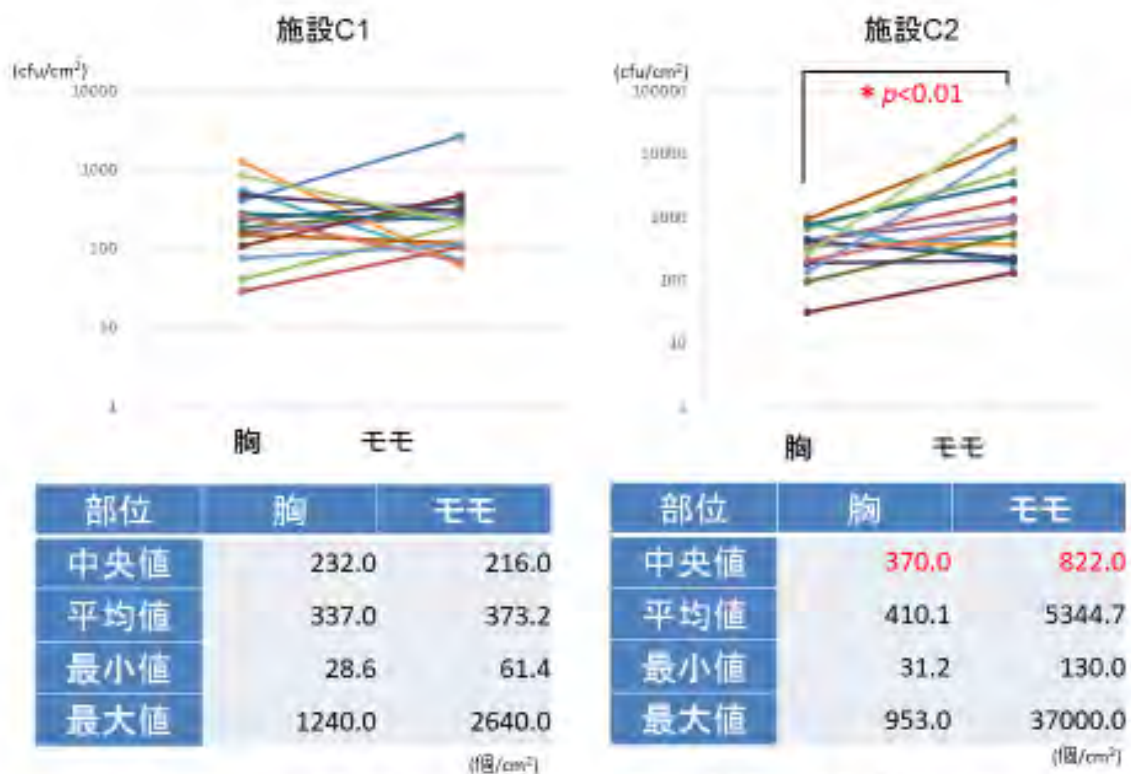


図17 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 鶏



図18 一般細菌数 | 施設間の比較 | 鶏

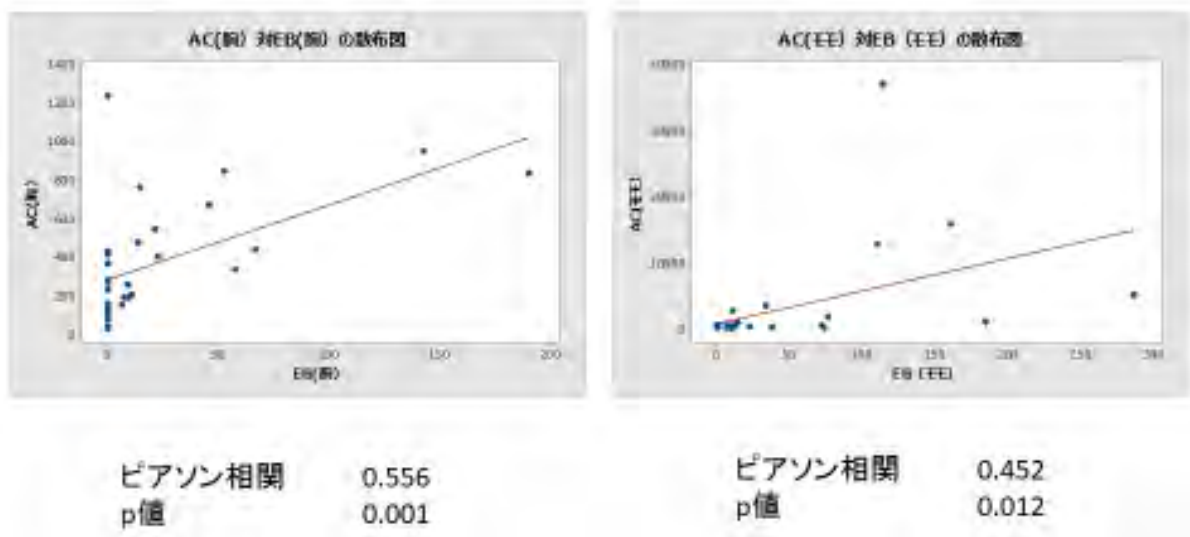


図19 一般細菌数 (AC)と腸内細菌科菌群数(EB)の相関関係 | 鶏

対象家畜	施設名	年間処理頭(羽)数 ^{*1}	従業員数 ^{*2}
牛	B1	10,400	80
牛	B2	18,110	330
豚	S1	118,806	124
豚	S2	472,000	240
鶏	C1	1,770万	356
鶏	C2	806.1万	211

*1: 平成28, あるいは29年度。概算を含む
*2: 一部実習生を含む

表2 糞便汚染指標細菌（大腸菌群を含む）の検出された検体の概要（牛）

検体名	施設	採材ポイント	拭き取り箇所	腸内細菌科菌群*1	大腸菌群*1	<i>E.coli</i> *1	<i>Salmonella</i> *3	一般細菌*1
B1-1-01-A	B1	冷蔵前	肛門	1.9	1.9	1.9	—	48.0
B1-1-14-B	B1	冷蔵前	ともばら	2.5	ud*2	ud*2	—	2390.0
B1-1-15-A	B1	冷蔵前	肛門	3.0	ud*2	ud*2	—	87.5
B1-1-15-B	B1	冷蔵前	ともばら	18.6	ud*2	ud*2	—	ud*2
*1：単位：cfu/cm ²								
*2：ud:検出限界未満								
*3： <i>Salmonella</i> は定性試験								

表3 糞便汚染指標細菌（大腸菌群を含む）の検出された検体の概要（豚）

検体名	施設	採材ポイント	拭き取り箇所	腸内細菌科菌群*1	大腸菌群*1	<i>E.coli</i> *1	<i>Salmonella</i> *3	一般細菌*1
S1-1-05-E	S1	冷蔵前	胸	2.7	ud	ud	—	156.0
S1-2-01-F	S1	冷蔵後	頸	1.9	ud	ud	—	79.5
S2-1-01-E	S2	冷蔵前	胸	4.7	ud	ud	—	42.5
S2-1-04-E	S2	冷蔵前	胸	2.5	ud	ud	—	25,000<
*1：単位：cfu/cm ²								
*2：ud:検出限界未満								
*3： <i>Salmonella</i> は定性試験								

表4 施設C2で処理された10羽の鶏における拭き取り箇所間の一般細菌数

検体番号	一般細菌数(cfu/cm ²)		
	胸	腹	モモ
1	3550	4700	6350
2	4050	28500	2600
3	14650	10850	3250
4	53500	10300	825
5	5300	5750	4750
6	4450	5400	8550
7	24000	5000	5900
8	1265	510	620
9	6800	9400	12500
10	1560	1445	22150
平均	11912.5	8185.5	6749.5
中央値	4875	5575	5325
最小値	1265	510	620
最大値	53500	28500	22150

表5 糞便汚染指標細菌（大腸菌群を含む）の検出された検体の概要（鶏）

検体名	施設	拭き取り箇所	腸内細菌科菌群*1	大腸菌群*1	<i>E.coli</i> *1	<i>Salmonella</i> *3	一般細菌*1
C1-1-01-H	C1	モモ	10.6	ud	ud	—	2640
C1-1-03-H	C1	モモ	37.4	11.4	10.6	—	198
C1-1-04-H	C1	モモ	11.4	ud	ud	—	280
C1-1-05-G	C1	胸	21.4	ud	ud	—	546
C1-1-05-H	C1	モモ	6.8	ud	ud	—	71.4
C1-1-07-H	C1	モモ	11.4	6	ud	—	404
C1-1-09-G	C1	胸	9.6	ud	ud	—	190
C1-1-09-H	C1	モモ	6	ud	ud	—	322
C1-1-10-G	C1	胸	13.6	ud	ud	—	476
C1-1-10-H	C1	モモ	8.8	ud	ud	—	296
C1-1-12-G	C1	胸	6.4	ud	ud	—	152
C1-1-12-H	C1	モモ	6	ud	ud	—	116.6
C1-1-14-G	C1	胸	9.2	ud	ud	—	258
C1-1-14-H	C1	モモ	9	ud	ud	—	69.2
C1-1-15-G	C1	胸	52.6	9.2	8.6	—	848
C1-1-15-H	C1	モモ	22.4	15	15	—	216
C2-1-01-G	C2	胸	57.6	ud	ud	—	336
C2-1-01-H	C2	モモ	72	ud	ud	—	498
C2-1-02-G	C2	胸	22.8	ud	ud	—	406
C2-1-02-H	C2	モモ	76	ud	ud	—	1820
C2-1-03-G	C2	胸	45.8	ud	ud	—	670
C2-1-03-H	C2	モモ	286	ud	ud	—	5140
C2-1-04-G	C2	胸	66.6	ud	ud	—	444
C2-1-04-H	C2	モモ	184	ud	ud	—	973
C2-1-05-G	C2	胸	190	72.9	71.9	—	838
C2-1-05-H	C2	モモ	73.2	ud	ud	—	176
C2-1-06-H	C2	モモ	6.4	ud	ud	—	366
C2-1-10-G	C2	胸	7.2	ud	ud	—	192
C2-1-11-G	C2	胸	14.2	ud	ud	—	764
C2-1-11-H	C2	モモ	33.2	ud	ud	—	3480
C2-1-12-G	C2	胸	142.8	ud	ud	—	953
C2-1-12-H	C2	モモ	160	ud	ud	—	16000
C2-1-13-H	C2	モモ	110	ud	ud	—	12800
C2-1-14-G	C2	胸	11	ud	ud	—	208
C2-1-14-H	C2	モモ	13.6	ud	ud	—	822
C2-1-15-H	C2	モモ	114	ud	ud	+	37000

*1：単位：cfu/cm²
 *2：ud:検出限界未満
 *3：*Salmonella*は定性試験

表 6 抽出した英語文献

文献 ID	書誌事項
1	Hardin, M.D., G.R. Acuff, L.M. Lucia, J.S. Oman, and J.W. Savell. 1995. Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (4) 368-374.
2	Kochevar, Sherri L., John N. Sofos, Robert R. Bolin, James O. Reagan, and Gary C. Smith 1997. Steam Vacuuming as a Pre-Evisceration Intervention to Decontaminate Beef Carcasses. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (2) 107-113.
3	FSIS Directive 6420.1 To access on the internet, go to: http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/FSISDir6420-1.pdf
4	Phebus, R.K., A.L. Nutsch, D.E. Schafer, R.C. Wilson, M.J. Reimann, J.D. Leising, C.L. Kastner, J.R. Wolf, and R.K. Prasai. 1997, Comparison of steam pasteurization and other methods for reduction of pathogens on surfaces of freshly slaughtered beef. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (5) 476-484.
5	Castillo, A., L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell, and G.R. Acuff. 1999. Decontamination of beef carcass surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. <i>Journal of Food Protection</i> . 62 (2) 146-151.
6	Kenney, P.B., R.K. Prasai, R.E. Campbell, C.L. Kastner, and D.Y.C. Fung. 1994. Microbiological Quality of Beef Carcasses and Vacuum-Packaged Subprimals: Process Intervention during Slaughter and Fabrication. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (6) 633-638.
7	Marshall, R.T., M.E. Anderson, H.D. Naumann, and W.C. Stringer. 1977. Experiments in Sanitizing Beef With Sodium Hypochlorite. <i>Journal of Food Protection</i> . 40 (4) 246 - 249.
8	Cabedo, L., J.N. Sofos, and G.C. Smith. 1996. Removal of bacteria from beef tissue by spray washing after different times of exposure to fecal material. <i>Journal of Food Protection</i> . 59 (12) 1284-1287.
9	N. Clayton, 2002. The Efficacy of Various Salmonella Intervention Methods Applied to Pork Carcasses during Slaughter (thesis from U. Kentucky).
10	Gorman, B.M., J.N. Sofos, J.B. Morgan, G.R. Schmidt, and G.C. Smith. 1995. Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray-washing as decontamination interventions for beef brisket adipose tissue. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (8) 899-907.
11	Smith. M.G., and A. Graham. 1978. Destruction of Escherichia coli and salmonellae on mutton carcasses by treatment with hot water. <i>Meat Science</i> . 2 (2) 119-128.
12	Nettles Cutter, C., and G.R. Siragusa. 1994. Efficacy of Organic Acids Against Escherichia coli O157:H7 Attached to Beef Carcass Tissue Using a Pilot Scale Model Carcass Washer. <i>Journal of Food Protection</i> . 57 (2) 97 - 103.
13	Smith, M. G. 1992. Destruction of bacteria of fresh meat by hot water. <i>Epidemiology and Infection</i> . 109 (3) 491-496.

文献 ID	書誌事項
14	Dickson, J.S., and M.E. Anderson. 1991. Control of Salmonella on Beef Tissue Surfaces in a Model System by Pre- and Post-Evisceration Washing and Sanitizing, With and Without Spray Chilling. <i>Journal of Food Protection</i> . 54 (7) 514 - 518.
15	Cutter, C., G.R. Siragusa. 1994. Application of chlorine to reduce populations of Escherichia coli on beef. <i>Journal of Food Safety</i> . 15. 67-75.
16	Dorsa, W.J., C.N. Cutter, and G.R. Siragusa. 1996. Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with Escherichia coli O157:H7, Listeria innocua, and Clostridium sporogenes. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (6) 619-624.
17	Castillo, A., Lucia, L.M. Kemp, G.K., and Acuff, G.R. 1999. Reduction of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on Beef Carcass Surfaces Using Acidified Sodium Chlorite. <i>Journal of Food Protection</i> . 62 (6) 580 - 584.
18	Van Netten, P., D.A.A. Mossel, and J. Huis In't Veld. 1995. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. <i>International Journal of Food Microbiology</i> . 25 (1) 1-9.
19	Epling, L.K., J.A. Carpenter, and L.C. Blankenship. 1993. Prevalence of Campylobacter spp. and Salmonella spp. on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. <i>Journal of Food Protection</i> . 56 (6) 536-537
20	Cacciarelli, M.A. W.C. Stringer, M.E. Anderson, and H.D. Naumann. 1983. Effects of washing and sanitizing on the bacterial flora of vacuum-packaged pork loins. <i>Journal of Food Protection</i> . 46 (3) 231 -234.
21	Gill, C.O., D.S. McGinnis, J. Bryant, and B. Chabot. 1995. Decontamination of commercial polished pig carcasses with hot water. <i>Food Microbiology</i> . 12 (2) 143-149.
22	Gill, C.O., and T. Jones. 1992. Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcasses. <i>Food Microbiology</i> . 9 (4) 335-343.
23	Gill, C.O., J.C.L. Harrison, and D.M. Phillips. 1991. Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. <i>Food Microbiology</i> . 8 (2) 83-94.
24	Smith, M.G. 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature o growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. <i>Journal of Hygiene Cambridge</i> . 94 (1) 289-300.
25	Troller, J.A. 1976. Staphylococcal growth and enterotoxin production factors for control. <i>Journal of Milk and Food Technology</i> . 39: 499-503.
26	Pereira, J.L., S.P. Salsberg, and M.S. Bergdoll. 1982. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. <i>Journal of Food Protection</i> . 45: 1306-1309.
27	Hanna, M.O., D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1976. Yersinia enterocolitica-like organisms from vacuum packaged beef and lamb. <i>Journal of Food Science</i> . 41: 1254-1256.
28	Hanna, M.O., J.C. Stewart, D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1977. Development of Yersinia enterocolitica on raw and cooked beef and pork at different temperatures. <i>Journal of Food Science</i> . 42: 1180-1184.

文献 ID	書誌事項
30	Palumbo, S.A. 1986. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? Journal of Food Protection. 49(12) 1003-1009.
31	Angelotti, R., M.J. Foter, and K.H. Lewis, 1961. Time-temperature effects on Salmonella and Staphylococci in foods. 1. Behavior in refrigerated foods. American Journal of Public Health. 51: 76-88.
32	Matches, J.R., and J. Liston. 1968. Low temperature growth of Salmonella. Journal of Food Science. 33: 641-645.
34	Palumbo, Samuel A., Jeffrey E. Call, Frankie J. Schultz, and Aaron C. Williams. 1994. Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of Escherichia coli. Journal of Food Protection. 58 (4) 352-356.
35	Gill, C.O., and J. Bryant. 1993. The presence of Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter in pig carcass dehairing equipment. Food Microbiology 10 (4) 337-344.
36	Kampelmacher, E.H., P.A.M. Guinee, K. Hofstra, and A. Van Keulen. 1961. Studies on Salmonella in slaughter houses. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe. 8:1025-1032.

※欠番 : 29、33

表 7 日本語文献

文献 ID	書誌事項
36 (J29)	森中重雄 他『と畜場におけるデハイダーの汚染状況調査と消毒法の検討』広島県獣医学会雑誌, (28), p.109-112 (2013)
37 (J57)	池田徹也 他『と畜場における塩素洗浄の効果について』北海道立衛生研究所報, (59), p.63-65 (2009)
38 (J87)	齊藤伸明 他『豚枝肉における体表由来汚染のインク着色による検討』日本獣医師会雑誌, 60(10), p.738-741 (2007)
39 (J122)	斉藤聡 他『牛解体処理施設における自主衛生管理の検証について』食品衛生研究, 52(5), p.77-86 (2002)
40 (J134)	尾金宰 他『食肉処理センターにおける大動物処理工程改善による効果』日本獣医師会雑誌, 53(3), p.159-162 (2000)
41 (J135)	品川邦汎 他『と畜場における衛生的な食肉(枝肉)生産に及ぼす豚体表の微生物汚染』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 17, p.332-336 (1999)
42 (J138)	板屋民子 他『作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染』日本獣医師会雑誌, 52(1), p.37-40 (1999)
43 (J140)	原啓二 他『剥ぎ上げ方式縦型スキナー使用時の豚枝肉汚染』日本獣医師会雑誌, 51(11), p.687-691 (1998)
44 (J145)	品川邦汎 他『食肉処理場における豚枝肉の微生物コントロールのためのと殺・解体方法の検討』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 15(1996), p.306-312 (1997)
45 (J147)	京都市衛生公害研『牛枝肉の細菌汚染検査について』京都市衛生公害研究所年報, 63(1996), p.120-121 (1997)
46 (J150)	渡辺正基 他『剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーにより全はく皮した豚と体の微生物汚染』北海道獣医師会雑誌, 41(5), p.111-114 (1997)
47 (J151)	品川邦汎 他『食肉処理場における危害分析重要管理点(HACCP)方式による微生物制御法確立のための基礎的研究』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.281-286 (1996)
48 (J152)	豊福肇『と殺後の温度管理による食肉の微生物制御に関する研究』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.277-280 (1996)
49 (J153)	京都市衛生公害研『牛枝肉の細菌学的汚染検査について』京都市衛生公害研究所年報, 62(1995), p.108-109 (1996)

文献 ID	書誌事項
50 (J157)	京都市衛生公害研 『皮はぎによる豚枝肉の細菌学的汚染検査について』 京都市衛生公害研究所年報, 61(1994), p.93-95 (1995)
51 (J159)	渡辺正基 他 『豚枝肉における豚毛の付着状況と微生物汚染状況』 北海道獣医師会雑誌, 39(6), p.120-124 (1995)
52 (J160)	早船克己 他 『と畜場及び食肉処理場の微生物制御に関する調査について』 北海道獣医師会雑誌, 39(3), p.55-57 (1995)

表 8 各文献が対象とする工程、動物種、病原体、パラメータ

工程	対象動物	病原体	パラメータ	文献 ID
トリミング	ウシ	サルモネラ、 <i>E.coli</i>	水洗浄、乳酸、酢酸	1
トリミング	ウシ	一般生菌数	スチームバキューミング	2
トリミング	ウシ	—	—	3
トリミング	ウシ	リステリア、サルモネラ、 <i>E.coli</i>	スチームバキューミング、ナイフトリミング、熱水	4
トリミング	ウシ	一般生菌数、腸内細菌、大腸菌群、耐熱性大腸菌群、 <i>E.coli</i>	スチームバキューミング、熱水、乳酸	5
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、リステリア、サルモネラ、エルシニア	乳酸	6
枝肉洗浄	ウシ	好気性菌	次亜塩素酸ナトリウム	7
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i>	酢酸、過酸化水素、リン酸三ナトリウム、水洗浄、熱水	8
枝肉洗浄	ブタ	サルモネラ	熱水、焼毛、塩素、乳酸	9
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i>	熱水、酢酸、リン酸三ナトリウム、過酸化水素、オゾン水、市販消毒剤	10
枝肉洗浄	ウシ、ヒツジ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ	水洗浄、熱水	11
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、シュードモナス	乳酸、酢酸、クエン酸	12
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ、アエロモナス、エルシニア、シュードモナス、リステリア	水洗浄、熱水	13
枝肉洗浄	ウシ	サルモネラ	滅菌蒸留水、酢酸	14
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i>	次亜塩素酸ナトリウム	15
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、リステリア、クロストリジウム・スポルゲネス	リン酸三ナトリウム、乳酸、酢酸、水洗浄	16
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ	亜塩素酸ナトリウム	17
枝肉洗浄	ブタ	サルモネラ	乳酸	18
冷却冷蔵	ブタ	カンピロバクター	冷蔵、水噴霧冷蔵、乳酸	19
枝肉洗浄	ブタ	好気性菌、嫌気性菌、ラクトバシラス	水洗浄、酢酸、次亜塩素酸ナトリウム	20
枝肉洗浄	ブタ	<i>E.coli</i>	熱水	21
冷却冷蔵	ブタ	<i>E.coli</i> 、シュードモナス	水噴霧冷蔵、冷凍トンネル冷蔵	22
冷却冷蔵	ウシ	<i>E.coli</i>	冷蔵	23
冷却冷蔵	ヒツジ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ	冷蔵	24
—	—	ブドウ球菌	(培養)	25
—	—	黄色ブドウ球菌	(培養)	26
—	ウシ、仔羊	エルシニア	(培養)	27
—	ウシ、ブタ	エルシニア	(培養)	28
冷却冷蔵	—	ボツリヌス、エルシニア、リステリア、 <i>E.coli</i> 、アエロモナス	(培養)	30

工程	対象動物	病原体	パラメータ	文献ID
冷却冷蔵	(食品)	サルモネラ、ブドウ球菌	(培養)	31
冷却冷蔵	—	サルモネラ	(培養)	32
冷却冷蔵	—	<i>E.coli</i>	(培養)	34
湯はぎ	ブタ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ、カンピロバクター	温湯	35
湯はぎ	ブタ	サルモネラ	温湯	36

動物	報数	文献ID
ウシ群	25	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14,15,17,17,23,27,28,37,38,40,41,43,48
ブタ群	19	9,18,19,20,21,22,28,35,36,39,42,44,45,46,47,49,50,51

工程	報数	文献ID
トリミング(汚染物除去)	5	1,2,3,4,5
移送	1	43
枝肉洗浄	16	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,20,21,38
消毒・殺菌	2	42,45
消毒洗浄	1	44
洗浄(機)	1	51
全行程	2	39,40
湯はぎ	2	35,36
内臓摘出	1	追加
剥皮群	6	37,41,46,47,49,50
冷蔵群	9	19,22,23,24,30,31,32,34,48

殺菌剤	報数	文献ID
乳酸	8	1,5,6,9,12,16,18,19
オゾン水	1	10
過酸化水素水	2	8,10
酢酸	10	1,7,8,10,12,14,16,20,42,45
塩素	3	6,9,51
次亜塩素酸ナトリウム	3	7,15,47
熱水	3	4,5,9
フマル酸	2	42,45
リン酸三ナトリウム	5	8,10,16,17,45
クエン酸	1	12
リン酸活性化－酸性化亜塩素酸ナトリウム	3	17,20,28
クエン酸活性化－酸性化亜塩素酸ナトリウム	1	17