

# I. 総括研究報告書

平成 30 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を推定に資する研究を進め以下の成果を得た。1) Real-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC)を用いて非定型 BSE 感染牛組織のプリオン感染価の定量的推定が可能なこと、また、空腸、骨格筋、副腎などに延髄の 1/1,000 から 1/100,000 程度のプリオンが存在することを明らかにした。2) ウシ PrP<sup>C</sup> 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより H-BSE 感染牛の副腎と最長筋に、延髄の 1/100,000 程度のプリオンが検出された。3) H-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザル 2 頭は接種後 3 年 5 ヶ月を経過したが、発症はみられなかった。L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルは接種後 2 年以内に発症したことから、H-BSE プリオンは L-BSE よりもヒトへの伝達性が低い可能性が示唆された。4) Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) 法を改良して異種間のプリオン伝達の推定を行い、CWD をシード、ウシ PrP<sup>C</sup> を基質とした場合に、CWD から C-BSE と非常に性質の似たプリオン株が生じることを見出した。5) L-BSE プリオンをカニクイザルにおいて伝播・増殖させても、伝播後に C-BSE プリオン様の株は容易に出現しないことを明らかにした。6) 関東地方に生息する外来種であるキョンの CWD モニタリングを実施し、CWD の発生がないことを確認した。

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等を実施した。平成 29 年度に実施した予備的試行結果を踏まえ、我が国で導入しやすい拭取り法による検証法プロトコールを完成させ、ウシ処理場 8 カ所、ブタ処理場 10 カ所、およびニワトリ処理場 4 カ所、合計 22 カ所のと畜場および食鳥処理場で同プロトコールを試行した。その結果、1) 塩素中和剤の使用法の説明、2) 指標細菌毎の希釈倍率の設定、3) 結果報告書式の改善、4) 拭取法による採材の作業者による個人差、などの問題点を解決するためプロトコールの改善が必要であると思われた。特に、米国・EU におけると畜場・食鳥処理場の内部検証・外部検証では、今回我々が実施した拭取法は実施しておらず、切除法を採用している。国際的な調和を考慮した場合、切除法の導入を検討する必要があることから、本研究では拭取法と切除法の比較を行った。切除法は拭取法に比べ、牛・豚では一般細菌数、鶏では一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群数について高値を示した。従って、定量的に微生物学的な評価を実施するためには、切除法による採材が好ましいと考えられた。また、欧米や EU で採用しているゼロトランス（目視による糞便等の汚染をゼロにすること）も HACCP 導入時には採用するべきであると思われた。

## 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、スクレイピ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。本年度は平成 29 年度に構築したプロトコールを、複数の食肉処理場、食長処理場で実施して、プロトコールの実用性の検証と改善点の洗い出しを行う。特に、検証法の国際調和を考慮した場合、我々が採用した拭取法と、欧米で採用されている切除法の相違は重要であることから、両

者の比較を実施する。また、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) RT-QuIC 法の結果から H-および L-BSE プリオンの感染価を推定する標準曲線を作製し、H-, L-BSE 感染牛の各種組織におけるプリオン感染価を定量化した。

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) プリオンの異種間伝播を試験管内で推定する方法として、PMCA 法を改良し、異種間伝播によりプリオン株の性状が変化する可能性を調べた。

1-4) H-BSE 脳内接種牛における PrP<sup>Sc</sup> の脳内出現時期と部位を解析し、これまでに実施した C-および L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の脳内出現時期と部位との相違を検討した。

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。また、L-BSE 経口摂取カニクイザルの PrP<sup>Sc</sup> の体内分布を調べた。

2-2) L-BSE を脳内接種により連続継代した

カニクイザルの神経病理学的解析を継続した。

2-3) L-BSE をカニクイザルに伝播した場合に、L-BSE プリオン株の性状が変化する可能性について検討した。

<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) と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコール試行

1-1) 検査対象施設として牛、豚をそれぞれ対象としたと畜場 (牛: 6 県 8 施設、豚: 7 県 10 施設)、ならびに大規模食鳥処理場 (3 県 4 施設) を設定した。

1-2) 平成 29 年度の本研究の成果から、「と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコール (案)」を作成し、これを上記施設で実施した。

1-3) 研究協力施設に対して事前アンケート、および事後アンケートを実施し、事前準備、試験実施、結果報告書書式、について意見を収集した。

2) 検体採取法 (拭取法と切除法) が衛生指標細菌数に及ぼす影響の検討

2-1) ウシ、ブタ、およびニワトリの枝肉を使用し、拭取法は「枝肉の微生物検査実施要領 (平成 26 年度)」(厚生労働省) に従い実施した。切除法は切除面積が 5 cm × 5 cm のステンレス版を用いて枝肉表面を切除した。

2-2) 衛生指標細菌数の測定は「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。

3) 熟成肉における衛生指標細菌、ならびに病原細菌の検出状況

3-1) 衛生指標細菌数として、一般細菌、大腸菌群/大腸菌、腸内細菌科菌群を計測した。

3-2) 病原細菌として、サルモネラ属菌、リステリア属菌、志賀毒素産生大腸菌 (STEC)、黄色ブドウ球菌の分離培養、カンピロバクター属菌の検出を行った。

(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は、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) H-, L-BSE 感染牛の各種組織におけるプリオン感染価の定量化

感染価が既知の H-BSE および L-BSE 感染牛脳乳剤を 10 倍段階希釈し、RT-QuIC を実施した。x 軸に感染価、y 軸に Amyloid formation rate (ARF [1/hr]) をプロットした。感染価の対数 ( $\text{Log}_{10}$ ) と ARF は直線関係が認められ、これを感染価推定用の標準曲線とした。

H-BSE 実験接種牛の末梢神経では、背根神経節で延髄の 1/10 から 1/100 程度の感染価、座骨神経や腕神経では延髄の 1/1,000 から 1/10,000 程度の感染価があると推定された。H-BSE 感染牛の骨格筋では咬筋から延髄の 1/100,000 程度のプリオンが検出された。

他の組織では、H-BSE、L-BSE 感染牛ともに空腸で RT-QuIC 陽性となり、プリオンの存在が示唆された。H-BSE 感染牛では延髄の 1/100,000 程度、L-BSE 感染牛では 1/1,000 程度と推定された。L-BSE 感染牛の副腎では延髄の 1/1,000 程度のプリオンの存在が推定された。

1-2) H-BSE 実験感染牛の可食部におけるプリオン感染価の測定

H-BSE 実験感染ウシ組織を脳内投与した Tg マウスは投与後 500 日を経過した。

これまで、副腎の投与群では、すべてのマウスが BSE に感染し、潜伏期間は  $408 \pm 9$  日であった。頸部迷走神経では、4 頭の BSE 感染陽性 Tg マウスの潜伏期間は  $430 \pm 58$  日であり、1 頭は観察中である。最長筋では、5 頭中 1 頭の BSE 陽性 Tg マウスが投与後 429 日に確認された。ほかの組織については、まだ神経症状を呈した Tg マウスはいない。

1-3) プリオンの異種間伝播によるプリオン株の性状が変化する可能性。

プリオン株として C-BSE, H-BSE, L-BSE, typical Scrapie, CWD の 5 種類、PrP<sup>C</sup> ソースとしてウシ PrP 発現 Tg マウス (TgBo)、ヒツジ PrP (ARQ) 発現 Tg マウス (TgOv)、シカ PrP 発現ノックインマウス (KiCe) の脳乳剤 (BH) を用い、連続 PMCA を実施した。

12 ラウンド目に増幅した PrPres のバンドパターンを比較したところ、CWD プリオンをシードとして、ウシ PrP<sup>C</sup> を基質とした時の PMCA 産物 (CWD/TgBo-PMCA) の生化学性状が C-BSE のものに類似したことから、これをマウスに脳内接種した。これまでの報告から、CWD プリオンはウシには感染するが (Hamir et al., 2007)、TgBo マウスには感染しないこと (Tamguney et al., 2006) がわかっている。CWD/TgBo-PMCA 産物を接種した TgBo マウスは平均  $237 \pm 19$  日で発症し、C-BSE および C-BSE をシード、ウシ PrP<sup>C</sup> を基質とした時の PMCA 産物 (C-BSE/TgBo-PMCA) を接種した TgBo マウスと有意差はなかった。さらに神経病理学的にも、CWD/TgBo-PMCA 産物を接種したマウスと、C-BSE を接種した場合と非常によく似ていたマウスは類似していた。以上の結果は CWD プリオンから C-BSE プリオン様の株が出現する可能性を示唆するものである。

1-4) H-BSE 脳内接種牛における PrP<sup>Sc</sup> の脳内出現時期と部位の解析。

昨年度作出した非定型 H 型 BSE 脳内接種牛 2 頭は、解剖時まで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なかった。病理解剖後、

WB 法による PrP<sup>Sc</sup> 解析では、接種後 4.7 か月、6.3 か月で解剖した牛の中脳、小脳、大脳皮質で、微量の PrP<sup>Sc</sup> を検出した。

これまでに実施した試験成績より、非定型 H 型 BSE 脳内接種牛においては、発症時期が接種後 12 か月、起立不能など飼養不能となる終末期が 18 か月であった。本試験では接種後 4.7 か月で PrP<sup>Sc</sup> を検出したことから、非定型 H 型 BSE 脳内接種牛では発症前のおよそ 7 か月頃から PrP<sup>Sc</sup> を検出できると考えられた。

## 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

### 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および L-BSE 経口摂取カニクイザルの PrP<sup>Sc</sup> の体内分布。

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種ザル 2 頭は、接種後 3 年 5 ヶ月を経過したが、体重は順調に増加しており、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。また、接種後 3 年 4 ヶ月に麻酔下で皮質脳波を測定したが、異常脳波は見られなかった。経口投与ザル (#26、#27) も接種後 3 年 5 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も共に認められていない。

我々が以前行った C-BSE プリオン脳内接種したサルは接種後 2 年 4 ヶ月～3 年 9 ヶ月で、L-BSE プリオン脳内接種したサルは接種後 1 年 7～8 ヶ月で発症した。従って、H-BSE プリオンは C-および L-BSE プリオンに比べ容易にはカニクイザルへ感染しないことが示唆された。

L-BSE を経口投与後、特徴的な臨床症状を呈さずに安楽死処置されたカニクイザルの中枢神経組織（脳の各部位、脊髄）へにおける PrP<sup>Sc</sup> の蓄積をウエスタンブロット法により検索した。神経組織には PrP<sup>Sc</sup> に由来する陽性シグナルは検出されなかった。従って、L-BSE は経口ルートではカニクイザルに感染しなかったことが最終的に確認された。

### 2-2) L-BSE を脳内接種により連続継代したカニクイザルの神経病理学的解析。

L-BSE プリオンを脳内接種したサルにおける PrP<sup>Sc</sup> の分布を検索した結果、神経系組織のみにおいて PrP<sup>Sc</sup> が認められた。中枢神経系では C-BSE プリオン脳内接種に比べ、高度の空胞変性が誘導され、PrP<sup>Sc</sup> はシナプスタイプの沈着を示した。空胞変性は前頭葉から頭頂葉、側頭葉皮質で高度に誘導された。PrP<sup>Sc</sup> の沈着パターンに継代による変化は認められなかった。

### 2-3) L-BSE をカニクイザルに伝播した場合に、L-BSE プリオン株の性状が変化する可能性について。

L-BSE プリオンをカニクイザルへの 2 代伝播・馴化（脳内接種）した場合に、元のプリオン株の性状が変化し、C-BSE プリオン様のプリオンが出現するかという点について調べた。ウシ C-BSE プリオンは C57BL/6J マウスへ伝播可能であるのに対し、ウシ L-BSE プリオンは C57BL/6J マウスに伝播しないので、接種材中にも C-BSE プリオンが含まれればマウスは発症する。実験の結果、C-BSE プリオンを 2 継代したカニクイザルの脳ホモジネートを脳内接種したマウス（＝陽性コントロール群）は接種後 285 ± 17.1 日（mean ± SD）で人道的エンドポイントに達したが、L-BSE プリオンを 2 継代したカニクイザルの脳ホモジネートを脳内接種したマウス（＝試験群）は、接種後 700 日を経過しても健常であり、実験計画書に従い安楽死に処した。従って、霊長類内では L-BSE プリオンは容易には C-BSE プリオン様の性状を有する株には変化しないと考えられた。

## <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) と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコール試行

ウシのと畜場 7 施設で 5 回実施した拭き取り検体における施設毎の一般細菌

数、および腸内細菌科菌群数（中央値）について、HACCP 導入/未導入施設で比較したところ、HACCP 未導入の施設（2施設、29検体）における一般細菌数（375.0 cfu/cm<sup>2</sup>）は、HACCP 導入済の施設（6施設、149検体）における一般細菌数（25.0 cfu/cm<sup>2</sup>）比べ、有意に低い値となった。腸内細菌科菌群は両施設で検出されなかった。

年間処理頭数別の比較では、1,500 頭未満の施設（4施設、77検体）における一般細菌数（38.0 cfu/cm<sup>2</sup>）と、1,500～20,000 頭の施設（4施設、101検体）における一般細菌数（51.0 cfu/cm<sup>2</sup>）との間で、有意差は認められなかった。

HACCP 導入状況/年間処理頭数別の比較では、年間処理頭数 1,500 頭未満の施設において、HACCP 未導入の施設（2施設、29検体）における一般細菌数（375.0 cfu/cm<sup>2</sup>）は、HACCP 導入済の施設（2施設、48検体）における一般細菌数（8.9 cfu/cm<sup>2</sup>）に比べ、有意に高かった。

さらに、HACCP 導入済の施設において、年間処理頭数 1,500 頭未満の施設（2施設、48検体）における一般細菌数（8.9 cfu/cm<sup>2</sup>）は、年間処理頭数 1,500～20,000 頭の施設（4施設、101検体）における一般細菌数（51.0 cfu/cm<sup>2</sup>）に比べ、有意に低かった。

ブタのと畜場 10 施設で 5 回実施した拭き取り検体における一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数（cfu/cm<sup>2</sup>）の最小値、最大値、平均値、および中央値を HACCP 導入/未導入施設で比較したところ、HACCP 未導入の施設（4施設、100検体）における一般細菌数（22.5 cfu/cm<sup>2</sup>）は、HACCP 導入済の施設（6施設、154検体）における一般細菌数（27.5 cfu/cm<sup>2</sup>）に比べ有意に低値を示した（p=0.028）。

年間処理頭数別の比較では、37,500 頭未満の施設（2施設、50検体）における一般細菌数（9.2 cfu/cm<sup>2</sup>）は、37,500～100,000 頭の施設（6施設、150検体）における一般細菌数（44.3 cfu/cm<sup>2</sup>）に比べ、有意に低値であった。100,000 以上の施設（2施設、54検体）も、一般細菌数に

おいて、37,500～100,000 頭の施設（6施設、150検体）に対して有意に低値（11.9 cfu/cm<sup>2</sup>）を示した。

食鳥処理場 4 施設は、全て検査時において HACCP 導入済みであったことから、年間処理頭数別に各指標細菌数を比較した。7,500,000 羽未満の施設（2施設、50検体）における一般細菌数（51.5 cfu/cm<sup>2</sup>）、および腸内細菌科菌群数（ud）は、7,500,000 羽以上の施設（2施設、35検体）における一般細菌数に比べ、有意に高かった。

## 2) 検体採取法（拭取法と切除法）が衛生指標細菌数に及ぼす影響の検討

6本の牛枝肉それぞれの筋肉 3カ所から拭取法で採取した検体の一般細菌数は ud~2,080.0 cfu/cm<sup>2</sup>、切除法では ud~37,440.0 cfu/cm<sup>2</sup>であった。脂肪 2カ所から拭取法で採取した検体の一般細菌数は ud~1,000.0 cfu/cm<sup>2</sup>、同切除法では ud~90,000.0 cfu/cm<sup>2</sup>であった。いずれも切除法により採取した検体において高値を示す傾向であった。なお、筋肉、脂肪いずれにおいても、腸内細菌科菌群、大腸菌、大腸菌群ともに検出限界以下であった。

3本の豚枝肉から、拭取法および切除法により採材した検体の一般細菌数は 3検体ともに、切除法で有意に高い値を示した。いずれにおいても、腸内細菌科菌群、大腸菌、大腸菌群は、拭取法、切除法ともに、すべて検出限界以下であった。

鶏：それぞれ 5羽ずつのと体から、拭取法および切除法により採材した検体の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数を測定した。胸部では、拭取法で採取した 5検体の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数の中央値は、それぞれ 43.6 cfu/cm<sup>2</sup>、0.6 cfu/cm<sup>2</sup>、ud、ud であった。切除法では 1,810.3 cfu/cm<sup>2</sup>、37.5 cfu/cm<sup>2</sup>、4.1 cfu/cm<sup>2</sup>、22.9 cfu/cm<sup>2</sup>であった。モモでは、拭取法で

採取した 5 検体の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数の中央値は、それぞれ 98.0 cfu/cm<sup>2</sup>、1.0 cfu/cm<sup>2</sup>、ud、0.4 cfu/cm<sup>2</sup>、同切除法では 1,812.0 cfu/cm<sup>2</sup>、38.7cfu/cm<sup>2</sup>、4.1 cfu/cm<sup>2</sup>、18.7 cfu/cm<sup>2</sup>であった。いずれも切除法で高い値を示し、一般細菌数（胸部 p=0.012, モモ p=0.037）、腸内細菌科菌群（胸部 p=0.012, モモ p=0.012）、大腸菌群（胸部 p=0.011, モモ p=0.012）で有意差が認められた。

### 3) 熟成肉における衛生指標細菌、ならびに病原細菌の検出状況

牛枝肉 5 検体について、熟成前は、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、および大腸菌群数のいずれの衛生指標細菌も検出されなかった。一方、29 日間の熟成後では、一般細菌数は、555~6,050 cfu/g 検出されたが、腸内細菌科菌群、大腸菌、および大腸菌群はいずれも検出されなかった。サルモネラ属菌、リステリア属菌、STEC および黄色ブドウ球菌は、いずれもの検体からも検出されなかった。

ブタ枝肉 5 検体について、熟成前、後における一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、および大腸菌群数を測定した。熟成前の枝肉では、1 頭から一般細菌が 280 cfu/g 検出されたが、これを除く全ての枝肉から、いずれの衛生指標細菌も検出されなかった。一方、22 日間の熟成後では、一般細菌数は ud~34,500 cfu/g、腸内細菌科菌群数が ud~1,165 cfu/g 検出されたが、大腸菌、および大腸菌群はいずれも検出されなかった。サルモネラ属菌、リステリア属菌、STEC および黄色ブドウ球菌は、いずれもの検体からも検出されなかった。

## 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

RT-QuIC は、高濃度の組織乳剤の存在により阻害されることが知られている。本研究でも、脳乳剤の希釈が最も低い 10<sup>-3</sup> より、10 倍に希釈された 10<sup>-4</sup> で ARF が高値を示した。つまり、10<sup>-3</sup> 希釈では RT-QuIC によるアミロイド形成反応が起こりにくくなっていた。このような条件下でも、空腸、副腎、咬筋などで RT-QuIC が陽性となり、感染価の定量的推定が可能であった。今後、さらに多くの組織でのプリオン感染価を推定する場合には、組織乳剤による RT-QuIC の阻害を考慮して、最近 Henderson らが報告した酸化鉄ビーズの使用により PrP<sup>Sc</sup> を捕捉して阻害物質の影響を軽減させる方法を応用するなどの工夫が必要である。

本研究では脳内接種牛の各種組織を使用した。神経系組織以外の組織でプリオンが存在したことから、非定型 BSE の感染リスクを評価する場合には、中枢神経系組織で増殖したプリオンが遠心性に広がり、危険部位以外の臓器・組織に存在する可能性を考慮する必要があると思われる。

RT-QuIC に加えて、プリオン感染価測定のゴールドスタンダードであるバイオアッセイでも、H-BSE 実験感染牛の末梢神経系組織や筋肉組織にプリオンが分布していることを確認した。昨年度までに作成した H-BSE プリオンの用量反応標準曲線に当てはめると、副腎および頸部迷走神経には 10<sup>2.2</sup> LD<sub>50</sub>/g および 10<sup>2.1</sup> LD<sub>50</sub>/g の感染価が存在すると考えられた。脳では 10<sup>7.4</sup> LD<sub>50</sub>/g の感染価であったことから、上記組織の感染価は脳の 1/100,000 程度と推測される。

連続 PMCA 法により CWD プリオンから C-BSE プリオン様の性状を有するプリオン株が産生された。この知見は、CWD プリオンが C-BSE プリオン様のプリオン株に変化するを示唆するものであり、C-BSE の再興を防止するために CWD の管理措置を強化する必要性を提起する科学

知見と思われる。

## 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。昨年度安楽死処置した L-BSE 経口投与カニクイザルは、神経症状の発症はなく、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が、本年、中枢神経系組織で PrP<sup>Sc</sup> が陰性であることが確かめられ、発症に至る感染は生じなかったことが確かめられた。しかし、定期的に採取した脳脊髄液や尿などの体液から連続 PMCA 法で一時的に PrP<sup>Sc</sup> が検出されことから、末梢組織での感染は成立している可能性は否定できないため、今後、末梢組織の解析を実施する必要がある。

H-BSE プリオン経口投与または脳内接種したカニクイザルは共に投与後 3 年 5 ヶ月を経過したが、発症はまだ見られていない。我々が以前行った C-BSE プリオン脳内接種したサルは接種後 2 年 4 ヶ月～3 年 9 ヶ月で、L-BSE プリオン脳内接種したサルは接種後 1 年 7～8 ヶ月で発症した。従って、L-BSE プリオンは容易に脳内接種により、カニクイザルに伝達されるが、H-BSE プリオンは C-および L-BSE プリオンに比べ容易にはカニクイザルへ感染しないことが示唆された。また、H-BSE プリオンは脳内接種により野生型マウス及び BoPrPTg マウスには伝達するが、HuPrPTg マウスへ伝達しないことが報告されていることから、H-BSE プリオンは霊長類には伝達しにくい可能性が示唆される。

## <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) と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコール試行

問題点の抽出を目的として、本研究でプロトコール実施者を対象としたアンケート調査を行った。その結果、事前準備において、大きな問題は無かったことから、本プロトコールの導入においては、スムーズに導入できるものと考えられる。また、試験の実施においても、拭き取りの部位、タイミングについて、問題であるとの回答は全くなく、実際の実施においても、問題なく実施できるものと考えられた。さらに、検体数については、本研究では施設の規模に関係なく、5 検体/回/週を連続する 5 週間としたため、小規模施設では、搬入家畜の不足により、実施が困難であったとの回答であった。実際には、各施設の規模に伴い、検討する検体数の設定を行う予定である。

一方で、プロトコールの改善が求められるとされたものとして、主に以下の 6 点が挙げられた。

- 1) 塩素中和剤の使用法の説明
- 2) 各指標細菌毎の希釈倍率の設定
- 3) 結果報告書式の改善
- 4) 拭取法による採材の作業者による個人差
- 5) 内部検証における各施設の状況に応じた実施
- 6) 実施時期の検討（鶏施設では、鳥インフルエンザ流行期間中の実施は困難である事）

今後、上記の抽出された問題点を反映させたプロトコールの改善が必要である。

本研究では、HACCP システム妥当性検証試験として、各施設において処理された枝肉の衛生指標細菌による評価のため、各施設で 25 検体の拭き取り調査を実施した際の中央値を用いて、全体の検体を母集団とした際の中央値と比較することで施設間差を見極められることから、本研究で検証したプロトコールは、各施設における枝肉の衛生状況を評価し、HACCP システム妥当性検証試験のうち、微生物学的手法として応用できるものと考えられる。

### 2) 検体採取法（拭取法と切除法）が衛生指標細菌数に及ぼす影響の検討

我が国は今まで拭取法が主に実施され

ており、世界の標準 (切除法) と異なることから、切除法と拭取法の成績について比較を実施した。

ウシ、ブタ、ニワトリのいずれの動物種においても、拭取法に比べ、切除法により採取した検体が一般細菌数、鶏については、腸内細菌科菌群、大腸菌群数についても高値を示した。以上の成績から、より感度良く、糞便汚染指標細菌を含め、定量的に微生物学的な評価を実施するためには、切除法により採材する方が好ましいものと考えられた。

### 3) 熟成肉における衛生指標細菌、ならびに病原細菌の検出状況

ドライエイジングによる熟成は、肉の柔軟化、旨味の濃さを引き出す一方で、病原細菌が増殖する可能性がある。本研究で検討した施設において、製造された熟成肉では、検討した病原細菌 (サルモネラ、リステリア、STEC、および黄色ブドウ球菌) は検出されず、適切に衛生管理が行われているものと考えられた。熟成肉加工では、加工施設側による熟成前の枝肉の衛生的な取扱いや、熟成庫内の衛生管理の確立が重要である。また熟成にかかる、各種の有用細菌を調べるために、メタゲノム解析により、微生物叢解析の変化を解析する必要がある。

## 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 を基質とする RT-QuIC 法は、非定型 BSE 感染牛の組織におけるプリオン感染価の定量解析に有用であった。定量的なプリオンの体内分布に関するデータは、非定型 BSE のヒトおよび動物への感染リスクを評価する上で重要な科学知見となる。
- 2) Tg マウスへの感染実験で、H-BSE 実験感染牛の末梢神経系組織や筋肉組織にプリオンが分布することが明らかとなった。

しかし、その感染価は、脳と比べて 1/100,000 より低いこと推定された。可食部にプリオンが存在することから、他の組織についてもプリオン感染性の有無を評価する必要がある。

- 3) 補助的因子を加えた改良 PMCA 法により、これまで効率の低かった CWD や L-BSE 等の高効率な変換が可能となった。またその改良 PMCA 法を異種間に適用したところ、CWD をシード、ウシ PrP<sup>C</sup> を基質とした PMCA では、CWD プリオンから C-BSE プリオンに性質の似たプリオン株が生じることが判明した。
- 4) 非定型 H 型 BSE 脳内接種牛では発症前のおよそ 7 か月頃から PrP<sup>Sc</sup> を検出できると考えられた。
- 5) H-BSE プリオン脳内接種または経口投与カニクイザルは接種後 3 年 5 ヶ月を経過したが、発症は認められなかった。先に行った非定型 L-BSE プリオンの脳内接種カニクイザルの発症までの期間と比較して、H-BSE プリオンは霊長類へ伝達しにくい可能性が示唆された。
- 6) L-BSE プリオンは霊長類を含めて多くの動物種に伝達可能であるが、霊長類内では L-BSE プリオンは容易には C-BSE プリオン様の性状を有する株には変化しないと考えられた。

<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) 作成した、と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコールは実用可能であるが、下記の問題点を反映させた改善が必要であると思われる。
  - ・塩素中和剤の使用方法の説明
  - ・各指標細菌毎の希釈倍率の設定
  - ・結果報告書式の改善
  - ・拭取法による採材の作業者による個人差

- ・内部検証における各施設の状況に応じた実施
  - ・実施時期の検討（鶏施設では、鳥インフルエンザ流行期間中の実施は困難である事）

- 2) 拭取法で採取した検体に比べ、切除法により採取した検体の方が、ウシおよびブタでは一般細菌数、ニワトリでは一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群数について高値を示し、定量的評価の精度を高めるためには、切除法による採材が好ましいと考えられた。
- 3) 今回調べた加工場では、熟成後に病原細菌は検出されなかったが、熟成後では、一般細菌数の増加が認められたことから、熟成肉加工では、熟成前の枝肉の衛生的な取扱いや、加工施設側の衛生管理が重要である。

## **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