

I. 総括研究報告書

令和元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) ウシ PrP 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより H-BSE 感染牛の末梢神経系組織と筋肉（大腿四頭筋、背最長筋、半腱様筋）のプリオン感染価は、脳と比べて、それぞれ 1/3,000 と 1/20,000 であることを明らかにした。2) 非定型 BSE プリオン検出用の Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) を改良して、非定型 BSE 感染牛組織のプリオン感染価を推定した結果、空腸、回腸、および咬筋からプリオンが検出されたが、上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋、および心筋からは検出されなかった。バイオアッセイの結果と比較して、反応系のさらなる改良が必要と考えられた。3) H-BSE 由来プリオンを脳内接種または経口投与したサルは共に投与後 4 年 5 ヶ月を経過したが、異常行動や神経・精神症状を呈しておらず、発症は見られなかった。L-BSE 由来プリオンと H-BSE 由来プリオンは霊長類への伝達性に違いがあることが強く示唆された。4) L-BSE を経口接種後未発症のカニクイザル由来の脳組織中から、RT-QuIC によりプリオンが検出され、L-BSE が経口ルートでサルに不顕性感染することが示唆された。5) 北海道大学と国立感染症研究所間で確認検査用のウエスタンブロット、帯広畜産大学と国立感染症研究所間で確認検査用の免疫組織化学の精度管理を実施した。ブラインドで試料を交換し確認検査用のプロトコールに準じて試験を実施した結果、結果は完全に一致し、検査精度が保たれていることが確認できた。

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・外部検証システムの構築を進めた。本研究班で作成した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証法（案）」の実効性を確認するため、と畜場（牛： 8 施設、豚： 12 施設）並びに大規模食鳥処理場（12 施設）で実証試験を実施した。その結果、微生物学的な HACCP 検証手法として実施可能な手法であることが確認できた。作成したプロトコールは IV.その他の成果物に掲載した。合格判定の暫定基準を提示したが、今後、牛の「ともばら」、豚の「胸部」、および食鳥とたいの「首皮」を対象とした微生物試験を通じ、と畜場および大規模食鳥処理施設の HACCP システムを評価するための暫定基準値の設定を進める必要があると考えられた。今後、実際の検証試験の実施には、1) 1 年以上かけて、当該手法により得られた全国的な成績を収集し、改めてわが国の実情に合った基準値を設定する、2) 採材頻度について検討する、3) 条件付き合格の許容検体数などを設定する必要がある。

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）

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）

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）

古岡 秀文（帯広畜産大学・畜産学部・基礎獣医学研究部門 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教授）

森田 幸雄（東京家政大学・家政学部 教授）

朝倉 宏（国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 部長）

A. 研究目的

最近、スクレイパーがヒトに伝達する可能性 (Cassard et al, 2014)、孤発性 CJD 患者の様々な末梢組織にプリオンが存在すること

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

そこで、H-BSE を接種したサルの解析、および BSE プリオン増幅技術による非定型 BSE 感染牛の可食部および特定部位に存在するプリオンの定量化により、感染リスクの推定を行う。また、定量解析に必要な技術の改良と精度管理を行う。さらに、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを推定するため、カンクイザル、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ルを、複数の食肉処理場、食長処理場で実施して、プロトコ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) 酸化鉄磁性ビーズで PrP^{Sc} を濃縮する方法を利用して、非定型 BSE プリオンを検出する RT-QuIC 法の改良を行った。
 - 1-2) 昨年度に続き、RT-QuIC 法とウシプリオンタンパクを発現する Tg マウス (TgBov) を用いて、H-および L-BSE 感染牛のプリオン体内分布の定量データをまとめた
 - 1-3) 異種動物間伝達による BSE プリオンの性状変化を調べるため、各種齧歯類への伝達試験を行い、産生されるプリオンの性状を解析した。
- 2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析
 - 2-1) 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、RT-QuIC 法あるいは PMCA 法を改良して、L-BSE プリオンが伝達したカニクイザルの PrP^{Sc} 検出用を構築した。
 - 2-2) 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。
 - 2-3) 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。
- 3) TSE 確認検査の精度管理
 - 3-1) TSE 確定検査機関である北海道大学、帯

広畜産大学、および国立感染症研究所で、BSE 試料をブラインドで相互提供し、免疫組織化学およびウエスタンブロットの検査精度を検証した。

<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び国内基準値設定の検討
 - 1-1) と畜場 (牛: 8 施設、豚: 12 施設) 並びに大規模食鳥処理場 (12 施設) を検討対象とした。平成 29、30 年度の本研究の成果から作成した「と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験令和元年度実施依頼プロトコール」案に従い、牛豚は本冷蔵庫搬入前にももばら (牛)、胸部 (豚) の 5 cm x 5 cm (25 cm²) を切除法により採材した。鶏は本冷却後に首皮または胸皮計 25 g を切除法で採材した。
 - 1-2) 週 1 回 5 検体を対象とし原則連続 6 週間採材した (1 施設につき計 30 検体。一部 7 週間 35 検体)。各検体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数についてペトリフィルムを用いて求めた。
- 2) 検証法の改善に関する検討
 - 2-1) 採材面積の縮小の可能性に関する検討: 冷蔵庫保管中の 3 頭分の牛枝肉及び豚 6 頭分の枝肉の、各々 3 部位の 25 cm² と 100 cm² の切除法における一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を測定した。
 - 2-2) 新規採材部位としてウシの頸部を検討した。と畜場 5 施設につき、原則 5 本の枝肉を用いて、本冷蔵庫搬入前に、ともばら (1 カ所/頭)、および頸部 (1~5 カ所/頭) の 5 cm x 5 cm (25 cm²) から切除法により採材した。

(倫理面への配慮)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコール等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱い、各々

の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

C. 研究結果

＜BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集＞

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

1-1) 非定型 BSE プリオンを検出する RT-QuIC 法の改良。

rCerPrP を基質とする RT-QuIC 法の改良として、酸化鉄磁性ビーズ (IOM) を用いて PrP^{Sc} を濃縮して RT-QuIC を行う方法は、平滑筋および骨格筋には応用可能であった。しかし、この方法を用いても、非定型 BSE 感染ウシの上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋、および心筋からプリオンは検出されなかった。

また、rCerPrP は、RT-QuIC による非定型 BSE プリオンの検出で、組織乳剤による影響を受けにくく、高感度かつ安定して微量のプリオンを検出できるという特性を有するが、この性質には rCerPrP の N 末端が関与していることが明らかとなった。

1-2) H-BSE 実験感染牛の可食部におけるプリオン感染価の測定。

TgBov を用いたバイオアッセイの結果がほぼ出そろった。迷走神経頸部と副腎のプリオン感染価はそれぞれ $10^{3.8}$ LD₅₀/g と $10^{3.9}$ LD₅₀/g で、中枢神経 ($10^{7.4}$ LD₅₀/g) と比べて 1/3,000 程度の感染価であった。可食部筋肉の最長筋や半腱様筋、大腿四頭筋は、それぞれ $10^{3.1}$ LD₅₀/g、 $10^{3.0}$ LD₅₀/g、 $10^{3.0}$ LD₅₀/g の感染価が蓄積していた。脳と比べて、1/20,000 程度の感染価であると推定された。

1-3) 異種動物間伝達による非定型 BSE プリオンの性状変化の解析。

BSE 伝達モルモットでは脳全体にプラーク状、微細顆粒状、放射状、び慢性の PrP^{Sc} の沈着が確認され、特に小脳において顆粒層の減数および分子層の菲

薄化を伴う小脳萎縮が顕著であった。BSE/mo/ham (マウス→ハムスター異種間伝播株) 株を伝達したモルモットでも、小脳において顆粒層の減数および分子層の菲薄化が見られた。BSE 由来株を接種されたモルモットでは特徴的な小脳病変が再現される傾向が認められたが、L-BSE 由来株を接種されたハムスターでは特徴的な小脳病変は認められなかった。BSE の各種齧歯類への異種動物間伝達における病理学的特徴の維持は、動物種とプリオン株の双方に影響を受けるが、プリオン株の影響がより大きいことが示唆された。

2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

2-1) RT-QuIC 法による L-BSE 経口投与サルへの PrP^{Sc} の解析

L-BSE 感染カニクイザル検体を用いた RT-QuIC 法を、反応基質としてヒト PrP23-231 とヒト PrP90-231 を用いて、最適化を図った。この方法を用いて、L-BSE 経口摂取 6 年後に、臨床症状が認められず安楽殺し、脳の MRI 撮像、WB、病理・免疫染色のいずれも陰性であったカニクイザル 2 頭 (#18, #19) の組織からプリオン検出を試みた。その結果、2 頭の大脳皮質乳剤より陽性反応が観察された。一方、脾臓組織乳剤では陰性であった。従って、L-BSE が経口ルートでサルに不顕性感染することが示唆された。

2-2) 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。

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種ザル (#24, #25) は、接種後 4 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は共に見られなかった。また、接種後 3 年 10 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。観察期間、体重は標準的な増加が見られた。経口投与ザル (#26, #27) も接種後 4 年 5 ヶ月を経過したが、運動障害、異常行動は認められなかった。

先の非定型 L-BSE 由来プリオンを脳内接種したサルでは 2 年以内に発症して

おり、その倍以上の期間を経ても H-BSE 脳内接種サルでは発症は見られない。このことから、同じ非定型でも L-BSE 由来プリオンと H-BSE 由来プリオンは霊長類への伝達性に違いがあることが強く示唆された。

2-3) 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プリオンの分布を検索した結果、神経系組織のみにおいてプリオンが認められた。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、プリオン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。L-BSE のサルにおける連続継代後も、プリオンの沈着パターンに変化は認められなかった。

3) TSE 確認検査の精度管理

令和2年1月～3月にかけて、TSE 確定検査機関である北海道大学と国立感染症研究所間で確認検査用のウェスタンブロット (WB)、帯広畜産大学と国立感染症研究所間で確認検査用の免疫組織化学の精度管理を実施した。ブラインドで試料を交換し確認検査用のプロトコールに準じて試験を実施した。WB の精度管理用として、北海道大学から、C-BSE、L-BSE、H-BSE 各1検体、および非感染ウシ脳乳剤の計5検体を国立感染症研究所研究所に、国立感染症研究所研究所からは、C-BSE2検体、L-BSE1検体、および非感染ウシ脳乳剤を北海道大学に提供し、ブラインド試験を実施した。結果を両機関に相互に送付し、一致性を確認した。結果は完全に一致し、C-BSE、非定型 BSE、および陰性を正確に区別できており、検査精度が保たれていることが確認できた。

免疫組織化学の精度管理として、BSE ウシおよび非感染ウシのギ酸処理済みのパラフィン包埋切片各2枚を帯広畜産大学と国立感染症研究所間でブラインドで交換し、各々の機関で免疫組織化学

を実施し、その結果を北海道大学に送付し、結果の一致性と染色パターンを確認した。BSE 感染と非感染ウシを正確に評価できており、染色パターンも適切であったことから、確認検査の精度は保たれていることが確認できた。

<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び国内基準値設定の検討

と畜場 (牛: 8 施設、豚: 12 施設) 並びに大規模食鳥処理場 (12 施設) で実施した実証試験の結果から、本研究班で検討した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証法 (案)」の実施は、HACCP 導入施設における微生物学的な HACCP 検証手法として実施可能な手法であることが確認できた。今後さらなる検討は必要であるが、合格判定の暫定基準を提示した。

わが国の牛、豚をそれぞれ対象とした全国のと畜場 (牛: 8 施設、豚: 12 施設) 及び12の大規模食鳥処理施設において、本研究班で作成した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証法 (案)」に従い、切除法による採材を行い、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を求めた。各施設ごとに、「最小値」「最大値」「平均値」「50 パーセンタイル (中央値)」「80 パーセンタイル」「98 パーセンタイル」、並びに「標準偏差」の各値を求めた。

HACCP システムの妥当性を検証するための基準値の設定方法の候補としては、1) EU の事例、2) 米国の事例、3) その他の統計学的評価手法が挙げられた。牛では、1) EU 基準では、合格判定値 (m) 未満は 27-30 検体/施設、m 以上条件付き合格判定値 (M) 未満は、0~3 検体/施設、M 以上は全て 0 検体/施設であった。2) 米国参考基準では、m 未満は 18-29 検体/施設、m 以上 M 未満は、1~12 検体/施設、M 以上は 0~3 検体/施設であった。3) 「平均値+2 S.D.」の値は、784.5~30232.9 となり、当該値以上となった検体数は、1~5 検体/施設であった。

豚では、1) EU 基準では、m 未満は 28～30 検体/施設、m 以上 M 未満は、0～2 検体/施設、M 以上は全て 0 検体/施設であった。2) 米国参考基準では、m 未満は 17～30 検体/施設、m 以上 M 未満は、0～11 検体/施設、M 以上は 0～3 検体/施設であった。3) 「平均値+2 S.D.」の値は、781.5～13569.2 となり、当該値以上となった検体数は、1～3 検体/施設であった。

食鳥について、2) の米国参考基準を施設別に求めたところ、m 未満は 23～25 検体/施設、m 以上 M 未満は 4～7 検体/施設、M 以上は 1-2 検体/施設であったが、表 9 に示した処理方式別に求めた各基準値を用いて、各施設の成績分布を確認したところ、m 未満は 0～30 検体/施設、m 以上 M 未満は 0～8 検体/施設、M 以上は 0～30 検体/施設となり、施設間で大きく異なる結果を示すことが明らかとなった。

事後アンケートでは、使用器具については、と畜場のうち、牛処理施設（回答のあった 7 施設中）5 施設、豚処理施設（回答のあった 11 施設中）全ての施設で、「問題あり」との回答であった。食鳥処理場では、5 自治体中 2 自治体より作業台の確保に関して意見が挙げられた。

施設事業者への依頼については、牛では全て、豚では 2 施設で、「問題ない」との回答であったが、豚 9 施設では、「問題あり」との回答であった。施設事業者の反応としては、牛で 5 施設、豚で 4 施設に問題があった。採材部位に「問題あり」と回答されたのは、牛で 4 施設、豚で 8 施設であった。切除法については、牛施設では、「難しい」が 3 施設、「普通」が 4 施設、「易しい」は 0 であった。豚施設では、それぞれ 6 施設、4 施設、0 施設（未回答 1）であった。食鳥処理場については 5 自治体共に事業者の理解及び協力が得られたとの回答があった。

2) 検証法の改善に関する検討

採材領域の縮小について検討するために、牛 3 頭の左右の枝肉の臀部、ともばら、胸部および豚 4 頭の左右の枝肉の臀部、胸

部、頸部の 100 cm² (10 cm × 10 cm) と 25 cm² (5 cm × 5 cm) の 1 cm² あたりの菌数を比較した。

牛枝肉 100 cm² 及び 25 cm² の臀部、ともばら、頸部の 3 か所、および豚枝肉 100 cm² 及び 25 cm² の臀部、胸部、頸部の 3 か所の一般細菌数に有意差は無かった。一般細菌数にも有意差は無かった。よって、100 cm² の切除法でも、25 cm² の切除法でも、同様であることが判明した。

新規採材部位としての牛頸部を検討した。牛の処理施設 4 施設において、従来の「ともばら」に加え、「頸部」から切除法により採材し、同一施設内で処理された枝肉の両部位で採材された検体の一般細菌数を比較した。同一施設内で処理された枝肉の両部位間において、有意差は認められなかった。

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

平成 29 年から 3 年間の研究期間で、RT-QuIC によるプリオン検出法と TgBov を用いたバイオアッセイによるプリオン検出法を比較できる結果が得られた。RT-QuIC 法は 2 日程度で結果がえられ、簡便であり、かつ多検体を解析できる。一方、バイオアッセイは 2 年以上の期間を必要とし、多検体の解析には適さない。両者に長所短所はあるものの、バイオアッセイでは、可食部である骨格筋（大腿四頭筋、背最長筋、半腱様筋）から低レベルのプリオン感染価を検出できた。一方で、RT-QuIC では、酸化鉄磁性ビーズによる PrP^{Sc} 濃縮法を取り入れても、空腸、回腸、および咬筋からプリオンが検出されたが、上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋からはプリオンが検出されなかった。組織内に存在する微量のプリオンを RT-QuIC で検出する場合には組織乳剤による阻害を改善する必要があるが、

rCerPrP を基質として使用することで、組織乳剤による阻害をある程度回避できる。従って、簡便かつバイオアッセイに近い感度を有する RT-QuIC 法は、今後も組織におけるプリオン感染価の定量評価に有効な手法として活用できると思われる。

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(投与後 6 年を経過)は、神経症状、脳 MRI 撮像も異常所見は認められなかった。しかし、RT-QuIC により、2 頭 (#18, #19) の脳組織にある程度のプリオンが存在することが確認された。さらなる検証は必要であるが、L-BSE が経口ルートでカニクイザルのような真猿類にも感染が成立し、かつ不顕性感染となる可能性が示唆された。仮にヒトに不顕性感染する場合、脳外科手術などの医療行為による感染拡大を防止するために難しい対応が必要となる。

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 4 年 5 ヶ月を経過したが、発症はまだ見られていない。これまでの研究では、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予想される。このことは、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という報告と一致する結果である。

<と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発>

1) と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験及び国内基準値設定の検討

本研究で各施設から 1 週間に 5 検体、連続する 6 週間の採材、ならびに検査の実施(計 30 検体/施設:牛、豚ともに 1 施設は 29 検体)によって得られた一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数を母集団として、国内のと畜場等の HACCP システムを評価するための国内基準値案を、1) EU の事例、2) 米国の事例、3) その他の統計学的評価手法により暫定的に算出した。

その他の統計学的評価手法として、施設毎に微生物試験の成績から「平均値+2 S.D.」を算出して、EU 基準及び米国参考基準と比較検討した。その結果、牛では EU 基準の m、M の間にほとんどが含まれ、豚では、EU 基準の m ($4.0 \log \text{cfu/cm}^2$) より低値となるものがほとんどであった。すなわち、本研究で検討対象とした、国内のと畜場で処理された牛・豚枝肉は、EU 基準を満たし得る衛生状況を示すと考えられた。

一方、食鳥処理施設におけるデータは、各施設の処理方法の相違にも影響されることが予想され、施設間でのばらつきが大きく、「平均値+2 S.D.」による暫定基準値は、米国参考基準に基づいて算出された同数値に比べ、概して高い値となった。

施設間によりばらつきはあるものの、「平均値+2 S.D.」による基準値は、同一施設内における相対的な変動のモニタリングには適していると考えられた。但し、今後、全国的な調査を通じて得られたデータが集積した際に、客観的基準値設定をする方法として、引き続き検討が必要と考えられる。しかし、HACCP システムの点検の実施を要求する上限値として、本研究において算出された国内基準値のうち M 値を暫定的に参考とすることは可能と考えられた。

2) 検証法の改善に関する検討

採材面積の縮小の可能性を検討するために 100 cm^2 ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) と 25 cm^2 ($5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$) で採材したときの単位面積あたりの菌数を測定したが、牛枝肉、豚枝肉ともに調べた 3 部位で、一般細菌数では差が

無かったことから、採材部位を縮小しても検証作業で支障はないと思われた。

また、新規採材部位としての牛頸部の検討したが、「ともばら」に加え「頸部」および「胸部」の細菌数に、有意差は認められなかったことから、代替できるものと考えられた。採材の操作性を考えた場合、頸部に比べて胸部は検査員が立位で正対しており、採材は非常に容易となる。作業効率を考慮しても、牛枝肉の胸部を採材対象部位として選択しても差し支えないものと考えられた。

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) ウシ PrP 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより H-BSE 感染牛の末梢神経系組織と筋肉（大腿四頭筋、背最長筋、半腱様筋）のプリオン感染価は、脳と比べて、それぞれ 1/3,000 と 1/20,000 程度であることが明らかとなった。
- 2) 非定型 BSE プリオン検出用の RT-QuIC を改良して、非定型 BSE 感染牛組織のプリオン感染価を推定した結果、空腸、回腸、および咬筋から、中枢神経系組織の 1/1,000～1/100,000 のプリオンが検出されたが、上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋、および心筋からは検出されなかった。バイオアッセイの結果と比較して、反応系のさらなる改良が必要と考えられた。
- 3) H-BSE プリオンを脳内接種または経口投与したサルは共に投与後 4 年 5 ヶ月を経過したが、異常行動や神経・精神症状を呈していない。従って、L-BSE プリオン異なり、H-BSE プリオンは霊長類に伝達しにくいことが示唆された。
- 4) L-BSE を経口接種後未発症のカニクイザル由来の脳組織中から、RT-QuIC によりプリオンが検出され、L-BSE が経口ルートでサルに不顕性感染することが示唆された。
- 5) 北海道大学と国立感染症研究所間で確認検査用のウエスタンブロット、帯広畜産大学と国立感染症研究所間で確認検

査用の免疫組織化学の精度管理評価を実施した。検査精度が良好に保たれていることを確認した。

＜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) 本研究班で作成した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証法（案）」の実効性を確認するため、と畜場（牛：8 施設、豚：12 施設）並びに大規模食鳥処理場（12 施設）で実証試験を実施した。その結果、微生物学的な HACCP 検証手法として実施可能な手法であることが確認できた。なお、作成したプロトコールは IV. その他の成果物に掲載した。
- 2) 牛・豚枝肉を対象とした切除法による外部検証プロトコール案試行を通じ、1) EU 基準に比べて、2) 米国参考基準が、また、1) 2) に比べ、3) 「平均値+2 S.D.」がより厳しい基準値設定に至る可能性が本研究結果から推察された。
- 3) 牛枝肉及び豚枝肉では採材領域を 25 cm² に縮小しても評価できる。採材部位は、牛においては、「ともばら」に加え、「頸部」あるいは「胸部」についても、代替できるものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし