

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. 非定型 BSE プリオンを検出する RT-QuIC 法の改良

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究院・教授

分担研究者 山崎 剛士 北海道大学・大学院獣医学研究院・助教

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学・大学院獣医学研究院)

研究協力者 岩丸 祥文 (農研機構・動物衛生部門)

研究要旨

非定型 BSE 感染牛の組織にけるプリオン感染価の定量データは、ヒトへの感染リスクの推定ならびに特定危険部位の設定・見直しのための科学的知見として重要である。昨年度の本研究で、PrP^{Sc} の seeding 活性を検出することでプリオンの存在を検出する Reat-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) 法を用いて、H-BSE および L-BSE 感染ウシの組織中のプリオン感染価の定量解析を実施した。微量であるが、副腎、咬筋および空腸からプリオンを検出した。しかし、RT-QuIC 反応は高濃度の組織乳剤の存在により阻害されることから、より普遍的な非定型 BSE プリオン検出法を目指して、本年度は本法の改良を試みた。酸化鉄磁性ビーズ存在下で RT-QuIC を実施することで、空回腸および咬筋からの検出感度は上昇した。しかし、この方法を用いても、H-BSE 感染ウシでは咬筋以外の横紋筋組織からプリオンは検出されず、L-BSE 感染ウシでは骨格筋からプリオンは検出されなかった。一方、酸化鉄磁性ビーズを用いても、末梢神経からの検出感度は向上しなかった。昨年度の本研究で、全長シカ組換え PrP (rCerPrP: aa25-233) は、高濃度の組織乳剤の影響を受けにくく、RT-QuIC による H-BSE および L-BSE プリオンの高感度かつ安定的な検出に有用であることを報告した。しかし、世界の他研究機関では rCerPrP は使用されていない。そこで、RT-QuIC で、rCerPrP が高感度かつ安定的に非定型 BSE プリオンの検出を可能にする機構について解析した。その結果、rCerPrP の N 末端から aa149 の領域が、rCerPrP が高感度かつ安定的に非定型 BSE および CWD プリオンの検出に重要であること、rCerPrP の N 末端から aa94 を欠損させると、RT-QuIC における全長 rCerPrP の有用性が失われることが判明した。RT-QuIC における PrP N 末端領域の重要性はこれまで報告がなく、RT-QuIC の高感度化および安定化に向けての重要な知見と思われる。

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) に分類される。

各種動物への伝達性から、L-BSE は C-BSE よりもヒトへの感染性が高いと推測されている。一方

H-BSE の人への感染性は結論がでていない。非定型 BSE は、高齢牛で孤発的に自然発生する可能性が指摘されていることから、非定型 BSE 感染牛におけるプリオンの体内分布と組織における感染価の定量データは、ヒトへの感染リスクの推定、および特定危険部位の設定・見直し等の管理措置の適切性を判断するための重要な科学的知見となる。

昨年の本研究では、H-BSE および L-BSE プリオンを高感度かつ安定的に検出する Reat-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) 法を用いて、

非定型 BSE 感染ウシの末梢組織におけるプリオン感染価の推定を実施した。末梢組織では、副腎、空回腸、および咬筋からプリオンが検出されたが、RT-QuIC は反応は高濃度の組織乳剤の存在により阻害されることから、本法の改良を行い、非定型 BSE 感染ウシの可食部におけるプリオンの検出を実施した。また、我々は、RT-QuIC による非定型 BSE プリオンの検出に全長シカ組換え PrP (rCerPrP: aa25-233) を使用して良好な成績を得ているが、世界の他研究機関で rCerPrP を使用している機関はないことから、rCerPrP の有用性を検証するために、rCerPrP の組換え体を用いて、全長 rCerPrP の高感度かつ安定的な非定型 BSE プリオンの検出に必要な領域の同定を試みた。

B. 研究方法

1) 非定型感染牛組織

感染価をウシ PrP を過発現するトランスジェニックマウスで測定済みの H-BSE および L-BSE の脳乳剤は農研機構・動物衛生部門から分与いただいた。それぞれの感染価は $10^{7.4}$ LD50/g と $10^{6.9}$ LD50/g である。また H-BSE ((カナダ)脳内接種牛 (#0728[接種後 19 月齢]、#9548[接種後 18 月齢])、および L-BSE (JP24) 脳内接種牛 (#4685[接種後 9 月齢]、#3383[接種後 14 月齢]) の組織も農研機構・動物衛生部門から分与いただいた。組織はマルチビーズシヨッカーを用いて 20%乳剤 (PBS) を作製した。筋肉は Tissue glinder (BMP) を用いて 20%乳剤を作製した。

2) RT-QuIC 法

基質として組換えシカ PrP (rCerPrP) を用いた。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、下方測定によりチオフラビン (ThT) 蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 10 mM Naphosphate, 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 rpm とした。RT-QuIC は一検体につき 4 ウェルを使用し、3 回以上の独立した実験を実施した。

3) 酸化鉄磁性ビーズ (IOM) による PrP^{Sc} の濃縮

Denkers らは、IOM による PrP^{Sc} の濃縮が、組織

乳剤中の RT-QuIC 阻害物質の除去に効果があることを報告した¹⁾。そこでこの方法を応用して、非定型 BSE プリオンの検出を行った。IOM と非定型 BSE 感染ウシ組織乳剤を室温で 6 時間混和し、マグネチックセパレーターで IOM を回収した。IOM を PBS に懸濁したものを反応液に加え、RT-QuIC を実施した。

4) 組換え rCerPrP

組換えマウス PrP (rMoPrP) とのキメラ PrP を作出した。N 末端が CerPrP aa25-149 で C 末端が MoPrP aa153-231 (rCerMoPrP) およびその逆のキメラ rPrP (rMoCerPrP)、および CerPrP の N 末端から aa93 までを欠損した rCerPrP94-233 を作製し、全長 rCerPrP: aa25-233 および rMoPrP: aa23-231 の反応性と比較した。

5) RT-QuIC の評価

RT-QuIC の反応時間は 60 時間とした。PBS を陰性対照としたときの蛍光強度の平均 + 5SD を threshold として、threshold を越えたウェルを陽性とした。陽性となるまでの時間を lag phase として RT-QuIC の効率の指標とした。また、seed の希釈列を作製し、RT-QuIC のエンドポイントを検出感度の指標とした。

(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)。

C. 研究結果

1) IOM の有用性の検討 (図 1)。

昨年度低いレベルのプリオンが検出された、空回腸と咬筋 (H-BSE #0728)、空回腸 (L-BSE #4685) を用いた。反応液中に添加できる組織乳剤の最高濃度である 10^{-3} では、IOM を使用した場合、L-BSE の空腸および回腸で、RT-QuIC 陽性となったが、lag phase が非常に長いことと、H-BSE では 10^{-3} で陽性とならなかったことから、0.1% の組織乳剤 (10^{-3}) 存在下でもプリオンを検出可能になるとい、著しい改善効果は得られなかった。しかし、IOM を使用することで、未使用時と比較して lag phase が短縮される傾向が認められ (H-BSE #0728 空腸および回腸、L-BSE #4685 空腸および回腸)、

H-BSE の空腸と咬筋、および L-BSE の回腸でエンドポイントが 1Log 向上したことから、平滑筋および横紋筋組織ではある程度の改善効果が得られることが判明した (図 1)。

そこで、IOM を用いる RT-QuIC で、昨年の研究でプリオンが検出されなかった骨格筋から、再度プリオンの検出を試みたが、上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋、および心筋ともに RT-QuIC で陰性であった (結果は示さず)。

また、IOM を用いる RT-QuIC を用いて、末梢神経からのプリオン検出を試みたが、検出感度の改善は認められなかった (結果は示さず)。従って、IOM による PrP^{Sc} の濃縮が応用可能な組織と応用できない組織があることが判明した。

2) 全長 rCerPrP の RT-QuIC での有用性の検証。

昨年度の研究で、全長 rCerPrP rCerPrP: aa25-233 が、組織乳剤の影響を受けにくく、非定型 BSE および CWD プリオンの高感度かつ安定的な検出に有用であることを示した。しかし、世界の他の研究機関で rCerPrP を使用している機関はないことから、rCerPrP の有用性を確認するために、rCerPrP の組換え体を作製して、RT-QuIC の反応性が解析した。

ハムスターやヨーロッパヤチネズミの組換え PrP を用いる場合は、N 末端側を欠損した rPrP を用いることで、RT-QuIC 反応の効率が上昇することが知られている。しかし、N 末端を欠損した rCerPrP aa94-233 を用いた場合、組織乳剤の影響を受けにくいという rCerPrP aa23-233 の特性が消失し、 10^{-3} の非感染脳乳剤存在下で、非定型 BSE プリオンが検出されなくなった (図 2)。また、N 末端が CerPrP aa25-153 で C 末端が MoPrP aa149-231 で構築されたキメラ PrP (rCerMoPrP) は、 10^{-3} の非感染脳乳剤存在下で反応は阻害されなかったが、N 末端が MoPrP aa23-149 で C 末端が CerPrP aa154-233 のキメラ PrP (rMoCerPrP) は、 10^{-3} の非感染脳乳剤存在下で反応が完全に阻害された (図 2)。従って、rCerPrP が高濃度の組織乳剤の影響を極端に受けずに RT-QuIC で非定型 BSE プリオンを検出できるという特性には、rCerPrP の N 末端領域が関与することが明らかとなった。

D. 考察

IOM を用いて PrP^{Sc} を濃縮することで、平滑筋

および骨格筋組織では非定型 BSE プリオンの検出が改善した。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ことから、これらの組織にプリオンが存在しているとしても、感染価は非常に低いと考えられる。一方、末梢神経では IOM の有用性が認められなかったことから、IOM は万能ではなく、適用できる組織を明らかにした上で使用する必要がある。

我々は世界的に使用実績が乏しい rCerPrP を RT-QuIC の基質として使用することで、組織乳剤による影響を低減し、非定型 BSE²⁾ および CWD プリオンの高感度かつ安定的な検出を実施している。rCerPrP の有用性を検証するために、rCerPrP 組換え体を使用して RT-QuIC を実施した結果、rCerPrP の N 末端が、組織乳剤による影響を低減して、RT-QuIC による非定型 BSE プリオンの高感度かつ安定的な検出に關与するという結果を得た。この結果は rCerPrP の有用性の分子基盤を説明するものであり、かつ、これまで報告のない新規性の高い知見である。

E. 結論

rCerPrP を基質とする RT-QuIC 法の改良として、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。

<引用論文>

1. Denkers ND, Henderson DM, Mathiason CK, Hoover EA. Enhanced prion detection in biological samples by magnetic particle extraction and real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol*, 2016 97(8): 2023-2029. doi: 10.1099/jgv.0.000515.
2. Sawada K, Suzuki A, Yamasaki T, Iwamaru Y, Maatsuura Y, Miyazawa K, Masujin K, Atarashi R, Horiuchi M. Estimation of prion infectivity in

tissues of cattle infected with atypical BSE by real time-quaking induced conversion assay. *J Vet Med Sci*, 81 (6), 846-850, 2019, doi: 10.1292/jvms.19-0003

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Enhancement of binding avidity by divalent binding is a key mechanism for abnormal isoform of prion protein-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody 132. *PLoS One*, 6;14(6):e0217944, 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0217944.
- 2) Sawada K, Suzuki A, Yamasaki T, Iwamaru Y, Maatsuura Y, Miyazawa K, Masujin K, Atarashi R, Horiuchi M. Estimation of prion infectivity in tissues of cattle infected with atypical BSE by real time-quaking induced conversion assay. *J Vet Med Sci*, 81 (6), 846-850, 2019. doi: 10.1292/jvms.19-0003
- 3) Hagiwara K, Yuko Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Okemoto-Nakamura Y, Sata T, Horiuchi M, Shibata H, Ono F. Tracking and clarifying differential traits of the classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys. *PLoS One*, 14(5):e0216807, 2019. doi:

10.1371/journal.pone.02168079

2. 学会発表

- 1) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Matsuura Y, Miyazawa K, Iwamaru Y, Horiuchi M. Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical BSEs. Prion2019, Edmonton, Canada, May 21-24, 2019.
- 2) Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Horiuchi M. Estimation of the binding site of inhibitory factors on recombinant PrP molecule by RT-QuIC. Prion2019, Edmonton, Canada, May 21-24, 2019.
- 3) Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Horiuchi M. Analysis of the unique reactivity of rCerPrP in real-time quaking-induced conversion reaction. Asian Pacific Prion Symposium 2019, Wako, Japan, Oct 3-4, 2019.
- 4) Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Direct effects of generating PrPSc and consequences in neuron-enriched primary cultures. Asian Pacific Prion Symposium 2019, Wako, Japan, Oct 3-4, 2019.

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

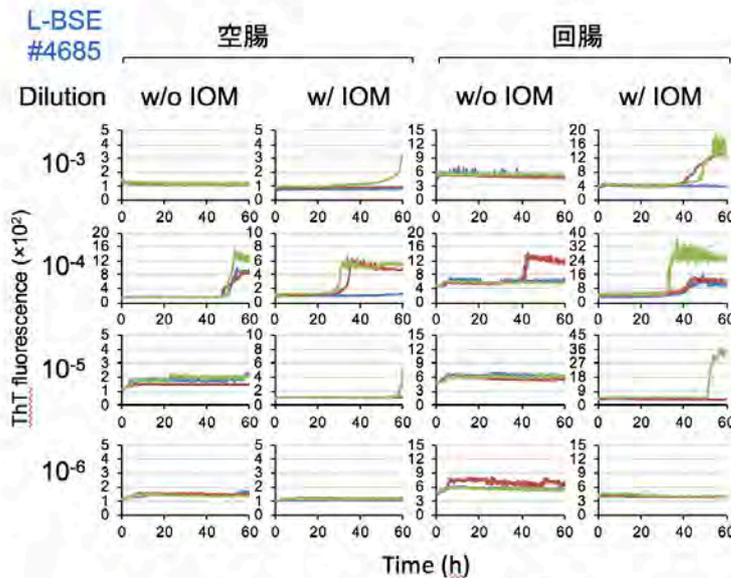
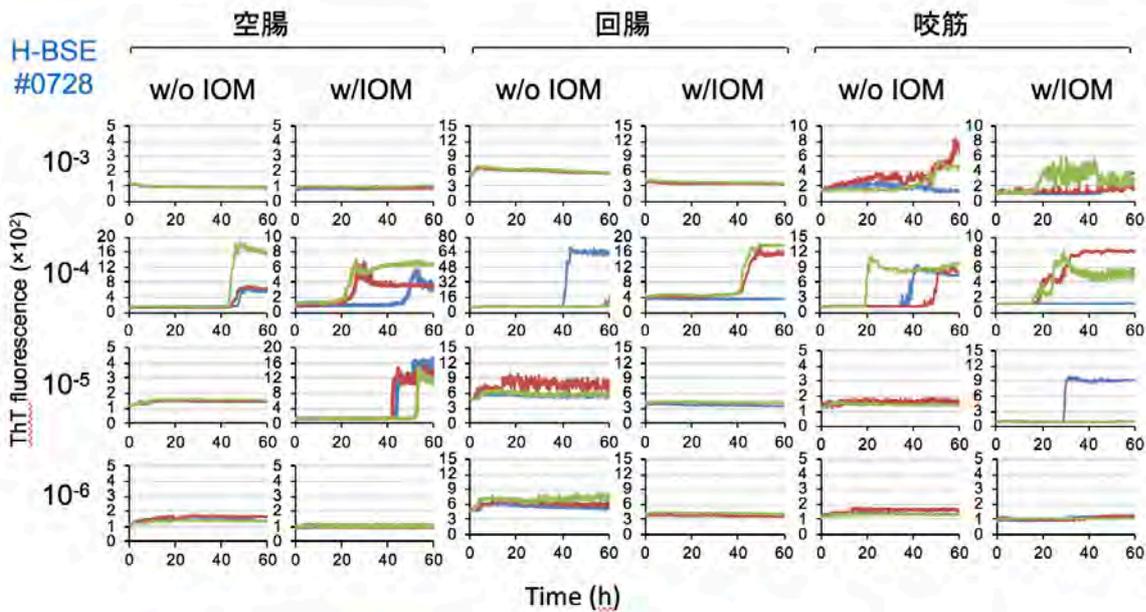


図1. IOMによるPrP^{Sc}濃縮の有用性

IOMを使用しない通常のRT-QuIC (w/o IOM) とIOMを使用したRT-QuIC (w/IOM) の効率とエンドポイントを比較した。H-BSE #0728 (上段) は昨年度の研究でプリオンが検出された空腸、回腸、および咬筋を使用した。空腸と咬筋ではエンドポイントが1Log上昇した。また、3種の組織ともに、 10^{-4} 希釈におけるlag phaseの短縮が認められた。L-BSE #4685 (上段) は、昨年度の研究でプリオンが検出された空腸および回腸を使用した。回腸ではエンドポイントが1Log上昇した。また、空腸、回腸ともに、 10^{-4} 希釈におけるlag phaseの短縮が認められた。

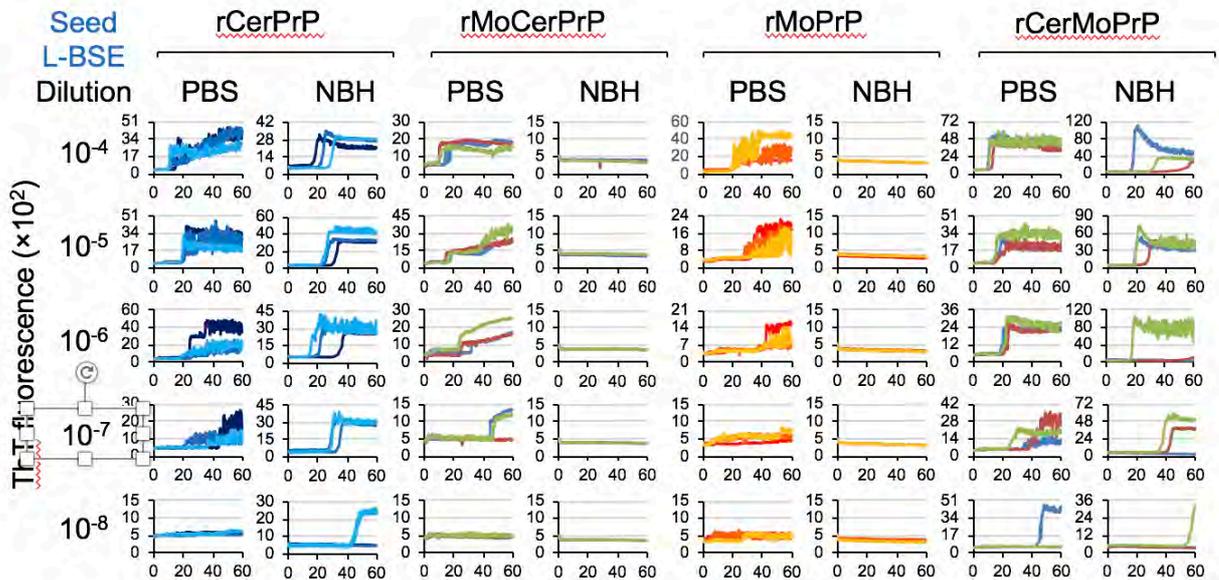
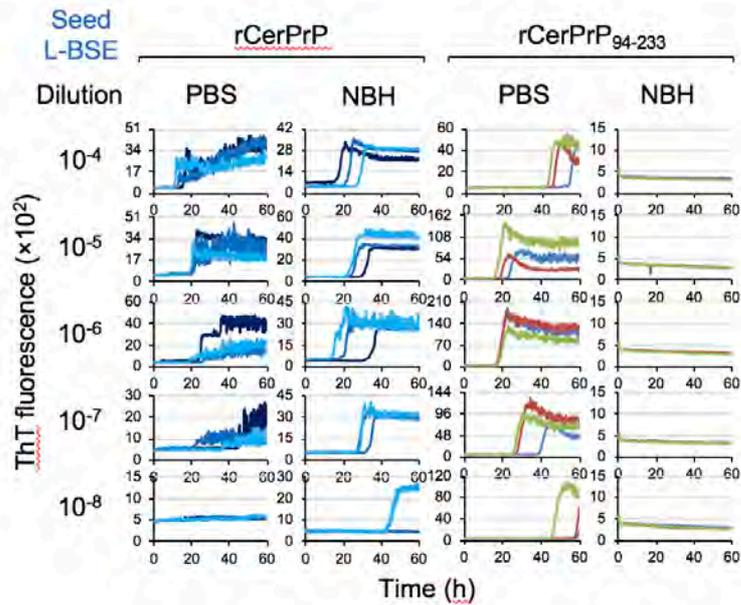


図2. 非定型 BSE プリオン検出用 RT-QuIC における rCerPrP の N 末端領域の重要性
 N 末端側を欠損する rCerPrP aa94-233 の RT-QuIC における反応性 (上段)。rCerPrP aa94-233 の反応性は 0.1% 非感染脳乳剤 (NBH) により完全に阻害された。
 rCerPrP と rMoPrP のキメラ rPrP の反応性 (下段)。rCerPrP の N 末端側を rMoPrP で置換した rMoCerPrP の反応性は 0.1% 非感染脳乳剤 (NBH) により完全に阻害された。一方、rMoPrP の N 末端側を rCerPrP で置換した rCerMoPrP の反応性は 0.1% 非感染脳乳剤 (NBH) で阻害されなかった。

2. L-BSE 経口接種カニクイザルからのプリオン検出の試み

分担研究者 新 竜一郎 宮崎大学医学部 感染症学講座 教授

研究協力者 今村 守一 (宮崎大学医学部・感染症学講座)

研究協力者 森 剛志 (宮崎大学医学部・感染症学講座)

研究協力者 柴田 宏昭 (医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センター)

研究要旨

本研究では、ヒトへの食物連鎖における感染の可能性が示唆されている非定型 BSE の一つである L-BSE がカニクイザルへの感染性を有するかについてプリオンの高感度増幅検出法である PMCA 法と RT-QUIC 法を用いて検証した。PMCA 法では安定的に増幅できる条件は見出せなかったが、RT-QUIC 法では安定して高感度の検出が可能なが示された。さらに RT-QUIC 法により、L-BSE 経口接種カニクイザル由来の脳組織中にプリオン活性が検出され、経口においても不顕性感染が成立していることが示唆された。

A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) には定型 BSE (C-BSE) と非定型 BSE が存在し、さらに非定型 BSE はプロテイナーゼ-K (PK) 抵抗性の PrP (PrPres) の見かけ上の分子量に基づいて 2 つ (L-BSE と H-BSE) に分類される。中でも L-BSE はカニクイザル等の霊長類やヒト PrP 発現トランスジェニックマウスへ実験的に感染することが報告されており、公衆衛生上、その制御は重要である。

実際の人間の食物連鎖を考慮すれば、L-BSE の経口接種での感染の可能性についての検証が必要である。本研究ではカニクイザルを用いて L-BSE を経口接種した個体中にプリオン蓄積や試験管内増幅法 (RT-QUIC 法: Real-time quaking-induced conversion や PMCA 法: Protein misfolding cyclic amplification) でプリオンシード活性が検出されるかどうか検証することを目的とする。

B. 研究方法

1) PMCA 法による L-BSE 経口接種カニクイザル脳組織中の L-BSE プリオンの検出

経口摂取したカニクイザルは 6 年後に安楽殺した時点では臨床症状は認められず、脳の MRI 撮像、WB、病理・免疫染色のいずれも陰性であった。L-BSE プリオン経口接種マカク脳組織を用いて、

以前、村山ら (BBRC 476: 563-568, 2016) が報告した補助因子としてジギトニン、ヘパリン、polyA、ポリリン酸、アルギニンエチルエステルを組み合わせた改良 PMCA 法でプリオンシード活性が検出可能かどうか試みた。

2) RT-QUIC 法による L-BSE 経口接種カニクイザル脳組織中の L-BSE プリオンの検出

最初に脳内接種カニクイザルの第 2 継代個体 (#23) 由来の大脳皮質乳剤をシードとして RT-QUIC 法の最適化を行った。その後、経口接種カニクイザル 2 頭 (#18, #19) 由来の大脳皮質乳剤および脾臓組織乳剤をシードおして RT-QUIC 法による検出を試みた。RT-QUIC 法は、攪拌機能付き蛍光プレートリーダーはテカン社製の F200 と BMG 社製のオメガの 2 つの機器を用いて比較検討した。

(倫理面への配慮)

L-BSE 感染カニクイザル検体は、独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類研究センターより、共同研究として提供された。カニクイザルを用いた実験は、同霊長類研究センターの動物飼養管理規則と霊長類学会の「霊長類を用いた動物実験の指針」に基づいて行われた。L-BSE 感染実験は、独立行政法人医薬基盤研究所の動物福祉・動物管

理・使用委員会および動物倫理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 感染カニクイザル検体を用いた PMCA 法による L-BSE プリオン高感度検出法の確立

村山らの報告した PMCA 法に準じた方法と昨年度報告した改良 PMCA 法で L-BSE 感染カニクイザル脳組織中の L-BSE プリオンの高感度検出を試みた。補助因子としてヘパリン、polyA、ポリリン酸、アルギニンエチルエステルを様々な組み合わせで、PMCA 法を行った (図 1)。一定レベルの増幅は見られたが、増幅効率が安定せず、また感度も不十分であった。

2) L-BSE 感染カニクイザル検体を用いた RT-QUIC 法による L-BSE プリオン高感度検出法の確立

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、反応バッファーとしては PIPES7.0 25mM、NaCl 500mM、EDTA 1mM、そして SDS は 0~0.004% の条件で行い、最適化を図った (図 2)。L-BSE 経口接種カニクイザル 2 頭 (#18, #19) の大脳皮質乳剤より陽性反応が観察された (図 2)。一方、脾臓組織乳剤では陰性であった。

D. 考察

L-BSE 感染カニクイザル検体を用いた PMCA 法による L-BSE プリオン高感度検出法については今回は確立できず、さらなる検討が必要と思われた。一方、RT-QUIC 法では L-BSE を脳内接種したカニクイザル由来脳乳剤の 10^{-10} 希釈レベルまでの検出が可能であった。さらに経口接種群の脳乳剤中からも RT-QUIC 法で陽性反応を示したことから、経口接種においても発症には至らなくても不顕性感染が成立していることが示唆された。

E. 結論

①様々な補助因子を添加した PMCA 法を行ったが、L-BSE 感染カニクイザル由来の検体中のプリオンを高効率かつ安定的に増幅させる条件は今回は見出せなかった。

②RT-QUIC 法により非定型 BSE である L-BSE 感染カニクイザル由来の検体中のプリオンを高感度で検出できることが明らかとなった。また L-BSE 経口接種カニクイザル 2 頭の大脳皮質中のプリオン活性を検出され、感染が成立していることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sawada K, Suzuki A, Yamasaki T, Iwamaru Y, Matsuura Y, Miyazawa K, Masujin K, Atarashi R, and Horiuchi M. Estimation of prion infectivity in tissues of cattle infected with atypical BSE by real time-quaking induced conversion assay. *J Vet Med Sci.*, 81(6): 846-850, 2019
- 2) Fuchigami T, Kawasaki M, Koyama R, Nakaie M, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Ono M, Nishida N, and Nakayama M. Development of Radioiodinated Benzofuran Derivatives for in Vivo Imaging of Prion Deposits in the Brain. *ACS Infect Dis.*, 5(12): 2003-2013, 2019
- 3) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Mori T, Atarashi R, and Nishida N. Type I interferon protects neurons from prions in in vivo models. *Brain.* 142(4): 1035-1050, 2019

2. 学会発表

- 1) 森剛志, 今村守一, 高月英恵, 井口洋美, 大野美奈子, 新竜一郎. さまざまなリコンビナントプリオン蛋白を基質とした RT-QUIC 法の反応性の比較解析. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 (2019 年 10 月 29 日、東京、日本)
- 2) Takatsuki H, Mori T, Imamura M, and Atarashi R. Pentosan polysulfate induces latent prion infection in Fukuoka-1 strain-infected cells. *Asia Pacific Prion Symposium 2019 (Oct, 3 2019, Saitama, Japan)*
- 3) Imamura M, Miyazawa K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Mohri S, Takatsuki H, Mori T, and Atarashi R. Isolation of hidden minor prion conformers from classical scrapie isolates in advanced protein misfolding cyclic amplification in the presence of arginine ethyl ester. *Asia Pacific*

Prion Symposium 2019 (Oct, 3 2019, Saitama, Japan)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

図 1



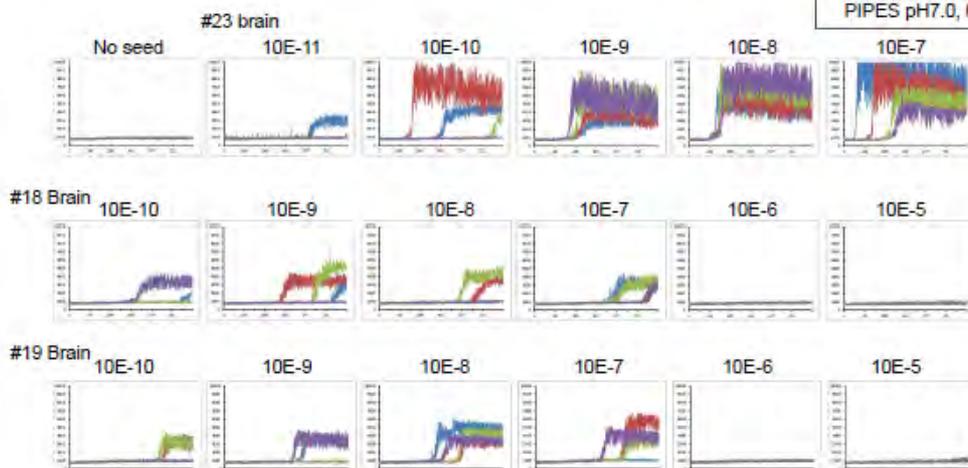
DIG : ジギトニン
 HP : ヘパリン
 PA : ポリA RNA
 PPS : ポリリン酸ナトリウム
 STP : トリポリリン酸
 DSS : デキストラン硫酸ナトリウム
 AEE : アルギニンエチルエステル

基質 : 50 μ L 10% ICR BH
 シード : 0.5 μ L 1% L-BSE感染マカク (#23) BH

図 2

RT-QUIC BH (Substrate= humanPrP23-231; Tecan3)

RT-QUIC program (42 C) Tecan3
 rec: humanPrP23-231 (#1270)
 shaking time: 30 sec (432 rpm)
 (Single Orbital)
 waiting time: 30 sec
 repeat nine times and then
 detect the fluorescence intensities
 Number of cycles: 864 (144 hour)
 with 2 mm beads x3
 PIPES pH7.0, 0.5 M NaCl



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

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 岡山理科大学 獣医学部 獣医保健看護学科 准教授

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およ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 H-BSE 感染ウシ脳乳剤を投与した。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。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 脳内接種ザ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。

A. 研究目的

定型 BSE (C-BSE) プリオンは食品を介してヒトに伝達することが示唆されており、非定型 BSE (L-BSE、H-BSE) プリオンも同様に食品を介してヒトに伝達する可能性がある。そこで、ヒトに近い霊長類を用いて、非定型 BSE プリオンの経口投与実験をおこない、食品を介してのヒトへの感染リスク・伝達性を調査・評価することを目的とする。既に L-BSE プリオンは経口によりウシ、原猿類に伝達することが報告されているが、H-BSE プリオンの経口投与による霊長類（真猿類）への伝達はまだ報告がない。そこで、カニクイザル（真猿類）を用いて H-BSE プリオンの経口投与実験をおこなった。しかしながら、H-BSE プリオンが種の壁を越えて、真猿類にそもそも伝達する報告がないので、直接脳に接種する実験も平行しておこない、H-BSE プリオンのヒトの健康におよぼす伝達リスクを評価し、公衆衛生上の安全対策等に役立てる。

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

出生・育成された投与時 1.5~2.0 歳の雄カニクイザル 4 頭を用いた。供試動物は、ABSL3 施設内の陰圧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℃、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

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：農研機構 動物衛生研究部門）感染ウシの 10%脳乳剤（0.2 mL：20 µg 脳重量相当）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：8 mg 脳重量相当）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、前述の量を週 2 回、4 週にわたって投与した。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おこなった。

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おこなった。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。

安楽死時に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おこなった後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により行う。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おこなう。

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、再評価をおこなった。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、摂食行動の観察をおこなった。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 of 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おこなった。

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 of 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、評価をおこなった。

3. 皮質脳波測定

メドミジン+ミダゾラム+ブトルファノール混合麻酔下で、脳波計 (EEG-1100 [日本光電]) の 8 電極誘導により、皮質脳波を測定した。測定終了後はメドミジン拮抗薬アンチセダンを投与し、覚醒を速やかに誘導した。

4. 脳の MRI 撮像データからの脳容積の算出

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おこなった。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。断層画像 3D 化ソフト (ExFactVR [日本ビジュアルサイエンス(株)]) を用いて、MRI 撮像データから脳の灰白質、白質、脳脊髄液腔の各容積を算出した。

(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 of 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おこなった。

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う。

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・栄養研究所及び自治医科大学の動物実験委員会の承認を得ておこなった。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ー委員会の承認を得ておこなった。

C. 研究結果

1) 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)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(data not shown)。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(data not shown)。観察期間、体重は標準的な増加が見られた(図1)。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ず、神経および精神症状も共に見られなかった(data not shown)。体重も標準的な増加が見られた(図1)。

発症ザルの脳容積(安楽殺時)

H-BSE 接種ザルは、まだ発症が見られないため、既に発症した L-BSE 脳内接種ザルの安楽死直後の脳 MRI 撮像データを用いて(図2a)、脳を3次元化し、輝度値の違いから灰白質、白質、脳脊髄液腔の各容積を算出した(図2b)。感染個体とほぼ同年代の非感染ザルのデータは1頭しかないが、L-BSE 感染ザル4頭は非感染ザルと比較すると、灰白質の容積が減り、脳脊髄液腔の容積が増える傾向が見られた(図3)。

D. 考察

H-BSE プリオン経口投与または脳内接種したカニクザルは共に投与後4年5ヶ月を経過したが、発症はまだ見られていない。非定型である L-BSE

プリオンおよび H-BSE プリオンは共にウシへの脳内接種実験から伝達性が確認されており、L-BSE プリオンおよび H-BSE プリオンのウシでの潜伏・発症期間に大きな差は無いと報告されている。我々が以前おこなった L-BSE プリオンを脳内接種したサルは、接種後1年7~8ヶ月で発症した。C-BSE プリオンを脳内接種したサルでは接種後2年4ヶ月~3年9ヶ月で発症が見られており、今までの潜伏期間を超えても H-BSE プリオンでは発症は見られなかった。また、H-BSE プリオンは脳内接種により野生型マウスおよびウシ型プリオン遺伝子トランスジェニックマウスには伝達が認められたが、ヒト型プリオン遺伝子トランスジェニックマウスへの伝達は認められていない。以上のことから、H-BSE プリオンの霊長類、ヒトへの伝達性は従来の C-BSE プリオンや L-BSE プリオンと比べ、種の壁を越えにくいことが示唆された。引き続き、経過観察をおこない、H-BSE プリオンのサルへの伝達性を確認する。

以前おこなった C-BSE プリオンまたは L-BSE プリオンを脳内接種した感染実験では、発症したサルの脳を安楽死直後に MRI 撮像すると、脳室拡張を伴う脳の萎縮所見が見られた。そこで、客観的な解析をおこなうために、今回、発症したサルの脳 MRI 撮像データを3次元化し、灰白質、白質、脳脊髄液腔の各容積を算出した。その結果、非感染ザルと L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザル4頭を比較したところ、発症ザルでは灰白質容積の減少、脳脊髄液腔容積の増加傾向が見られた。神経領域である灰白質容積の低下が神経活動の低下、脳脊髄液腔容積の増加が脳室拡張と関連していることが示唆された。なお、#023の脳脊髄液腔の容積は非感染ザルに比べると小さい結果となっている。これは潜伏期間や発症期間が他の発症個体に比べ短い事もあり、脳脊髄液腔への影響が出る前に安楽死をおこなったことが影響しているのかもしれない。従って、今後、各個体の臨床経過と照らし合わせて、脳容積のデータを解析する予定である。

E. 結論

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4年5ヶ月を経過したが、発症はみられなかった。L-BSE プリオンは、カニクイザル脳内へ接種すれば接種後2年以内に発症して

おり、伝達性が確認されている。H-BSE プリオンは霊長類へ伝達しにくい可能性があり、食品を介したヒトへの伝達リスクは、C-BSE や L-BSE に比べ、低い事が示唆された。引き続き、経過観察を続け、H-BSE プリオンのヒトへの伝達・感染リスクを評価する。

F. 健康危険情報

該当なし

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

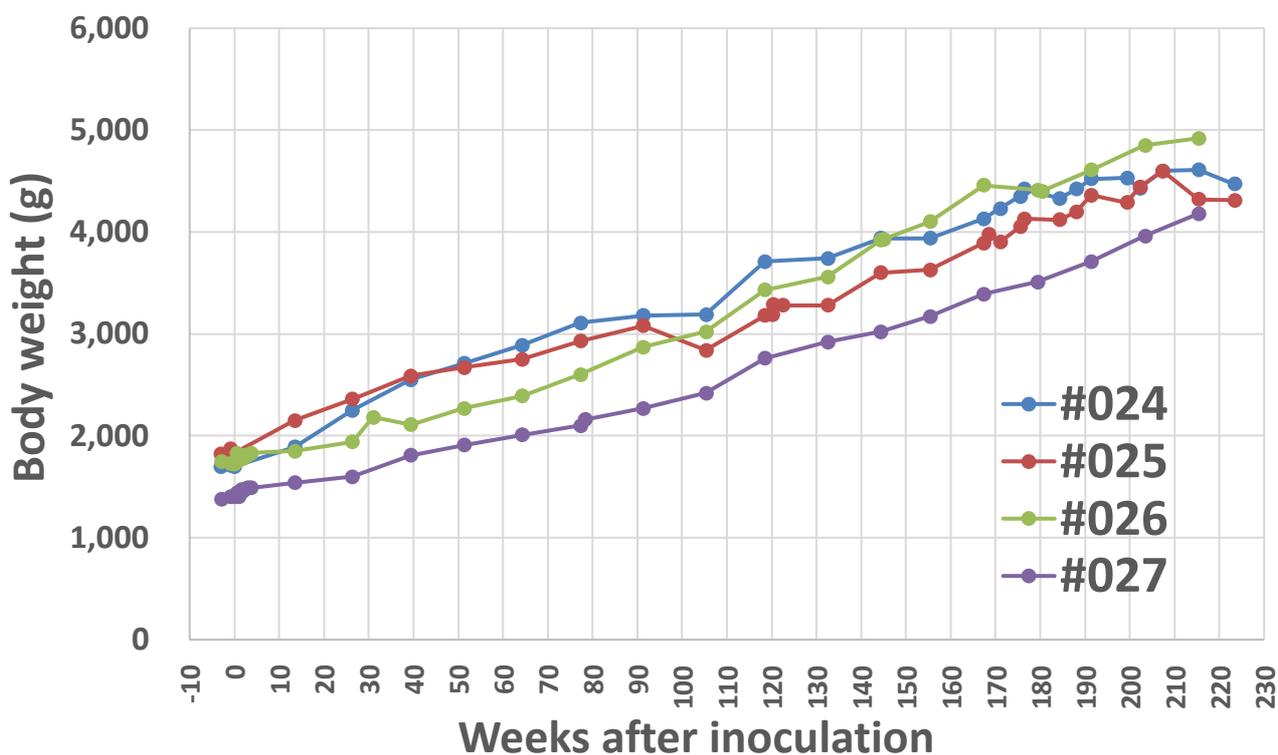


図 1. H-BSE 由来プリオン感染カニクイザルの感染後の体重推移
脳内接種ザル (#24、#25)、経口投与ザル (#26、#27)

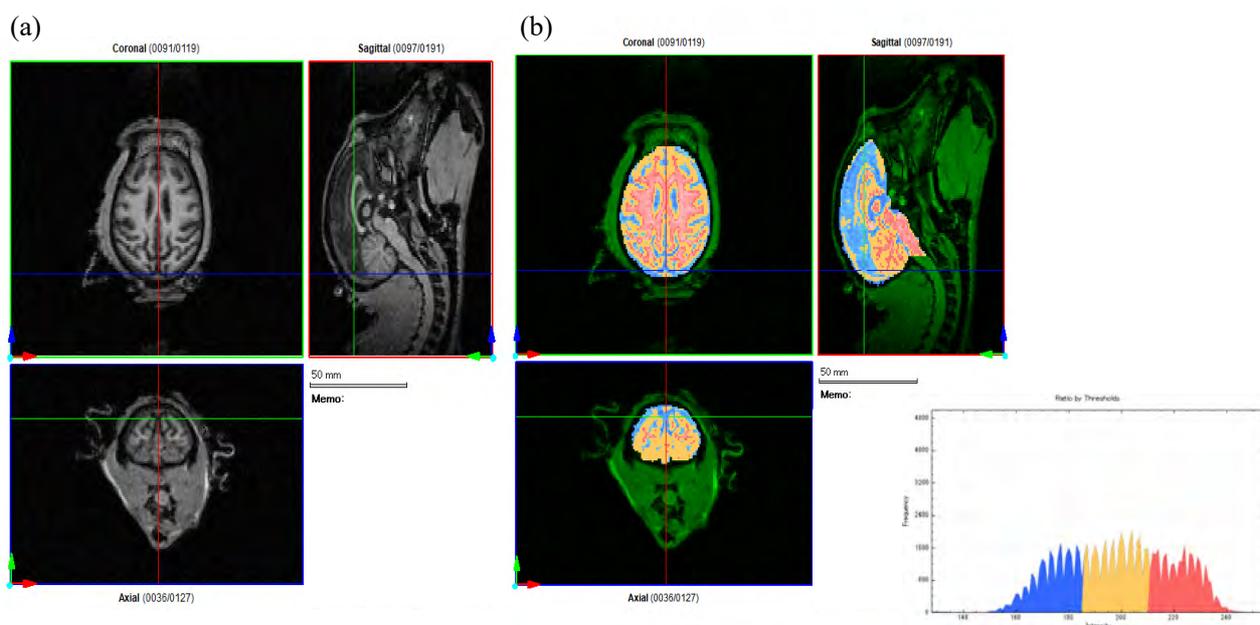


図 2. L-BSE 由来プリオン脳内接種カニクイザルの安楽殺直後の頭部の MRI 画像
(a):脳内接種ザル (#23) の T2 強調画像 (水平断、冠状断、矢状断)、(b):輝度による灰白質 (橙色)、
白質 (朱色)、脳脊髄液腔 (水色) 領域の解析画像

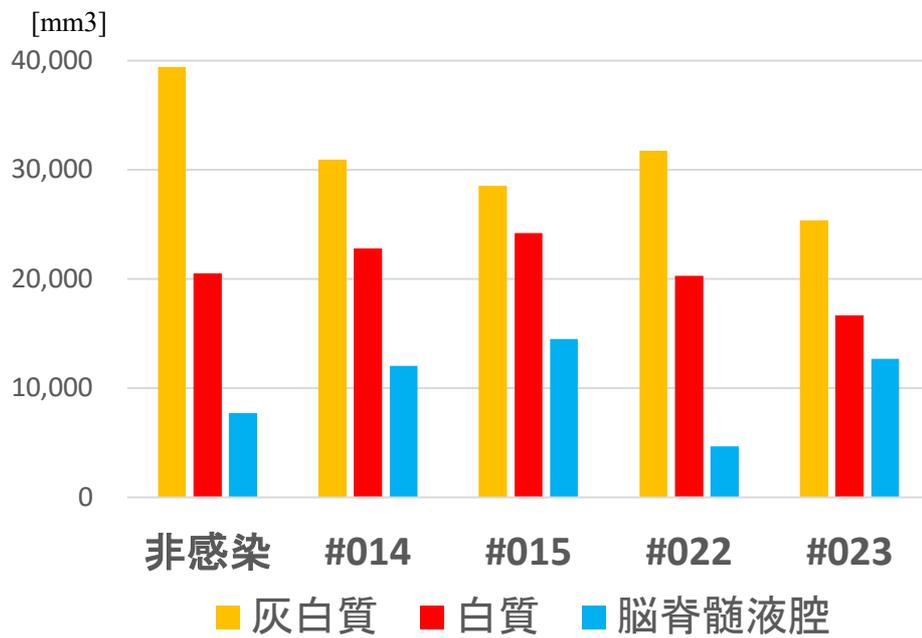


図 3. L-BSE 由来プリオン脳内接種カニクイザル脳の灰白質、白質、脳脊髄液腔の各容積 (安楽殺直後)
 非感染：非感染ザル、脳内接種ザル (#14、#15、#22、#23)

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 主任研究官

研究要旨

伝達性海綿状脳症：TSE(Transmissible spongiform encephalopathy)はヒトをはじめ数種の動物種で確認されている。ウシにおける TSE はウシ海綿状脳症(BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy)として知られ、これまでに定形および非定形 BSE 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、ヒトへもウシを介して経口的に感染し変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD: variant Creutzfeldt-Jakob Disease)を誘導する。非定型 BSE に分類される L-type BSE は本邦でも発生が確認されているが、ヒトへの感染事例は現在まで報告されていない。しかしながら動物モデルを用いた感染実験ではヒトへの感染性が示唆されている。これまでの我々の研究においてもカニクイサルへの脳内接種実験では高度の病原性を示すことが明らかとなっている。カニクイサルへの定型 BSE 脳内接種実験ではヒトの vCJD と同様の病理変化が誘導されることも明らかにしており、L-type BSE 脳内接種ならびにサルでの継代後の病理学的な変化を解析することで、ヒトへ L-type BSE が侵入した場合の病理像を想定することが可能と考えられる。本研究では、L-BSE がヒト生活環境に侵入した場合に誘導される病理学的特徴を明らかにする目的で、カニクイサルへの脳内接種および継代後の病理学的特徴の変化を解析した。

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病 (CWD: *Chronic wasting disease*) 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い、解析した 86 頭中に CDW が存在しないことを確認した。

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。本研究ではカニクイザルをモデル動物として用い、L-type BSE が誘導するヒトでの病理学的特徴を明らかにする。

2) シカでは TSE として慢性消耗病 (CWD: *Chronic wasting disease*) が存在することが報告されている。CWD は水平伝播する可能性も示唆さ

れ不断の監視が重要な疾患である。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。

3) プリオン病は C-BSE に代表される感染性プリオン病に加え、原因不明で孤発的に発生するプリオン病が存在する。ヒトでは孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) として知られており、ウシでは L-type や H-type が孤発性プリオン病と考えられている。その発生機序を明らかにするため、

正常型プリオンタンパク質の脳組織内での挙動を検討し、変動に関与する分子群について推察する。

B. 研究方法

1) L-BSE プリオン感染サル の病理学的解析

国内で摘発された L-BSE 罹患牛 (JP24) 脳乳剤を脳内接種したサル (1 代目) および感染サル脳乳剤を脳内接種したサル (2 代目) のプリオンの分布並びに病理学的特徴を検索した。また、L-BSE を経口投与されたサルの解剖を行い、プリオンの有無について検討した。

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の有無についてウエスタンブロット法を用いて検索した。

3) 正常型プリオンタンパク質の脳組織中での局在の検討

摘出された脳組織の固定を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて行い、正常型プリオンタンパク質が維持された標本を作製した。免疫組織化学的手法を用い、正常型プリオンタンパク質の局在について検討した。

(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 プリオン感染サル の病理学的解析

L-BSE のサルへの経口投与実験において、サルへの伝達性は確認できなかった。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(図 1)。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(図 2)。プリオンの沈着パターンに継代による変化は認められなかった(図 3)。

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 86 検体を採取しプリオンの存在についてウエスタンブロット解析を用いて検索した結果、陽性個体は認められなかった。

D. 考察

1) L-BSE プリオンの経口投与では伝達性は確認できなかった。脳内接種では中枢神経を主とした神経組織のみにプリオンは認められた。中枢神経系では高度の空胞変性誘導とシナプスパターンのプリオン沈着を示し、この病理学的特徴は継代により変化しなかった。L-BSE によって誘導される病理学的な変化はサルにおいては固定されたものであることが示唆された。

2) キョン検査体制の確立

現在、キョンは特定外来生物に指定されており駆除対象動物となっているが、個体数並びに分布領域が拡大傾向にある。本邦において CWD の発生は報告されておらず、本検討に用いた検体にも陽性個体は認められなかった。CWD は水平感染を起こす可能性も示唆されており、継続した検査が必要と考えられる。

3) 正常型プリオンタンパク質の脳組織中での局在の検討

通常の 20%ホルマリン固定やギ酸処理した脳組織では、正常型プリオンタンパク質を検出することが難しいが、4%PFA 固定した脳組織では正常プリオンを免疫組織化学的手法により検出することが可能であった(図 4)。PFA 固定した組織の観察により、アミロイドプラーク上に正常型プリオンが蓄積する場合、周囲神経細胞の正常型プリオンタンパク質は脱落し、プラークを形成しない部位では神経細胞中で正常型プリオンタンパク質が保持されていた(図 5)。

E. 結論

(1) L-BSE プリオン感染サル の病理学的解析

これまでの検討から、L-BSE 由来プリオンの経口摂取ではサルへの感染の可能性は低い、脳内

へ接種することで感染は成立する。C-BSE プリオンのサルへの接種実験は vCJD 患者で認められる病理学的変化を再現したことから、L-BSE プリオンがヒトへ感染した場合、高度の空胞変性の誘導とシナプスパターンのプリオン沈着を特徴とする病理学的変化が誘導される可能性が示唆された。

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、キョンは CWD 感受性動物であ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ている。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。

3) 正常型プリオンタンパク質の脳組織中での局在の検討

アミロイドプラーク形成部位と正常型プリオンタンパク質が保存される非形成部位における宿主因子の発現解析を行うことで、正常型プリオンのプラークへの沈着や細胞からの脱落に係る因子を同定することが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Hagiwara K, Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Okemoto-Nakamura Y, Sata T, Horiuchi M, Shibata H, Ono F. Tracking and clarifying differential traits of classical- and atypical L-type bovine

spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys. PLoS One. 2019 May 16;14(5):e0216807.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

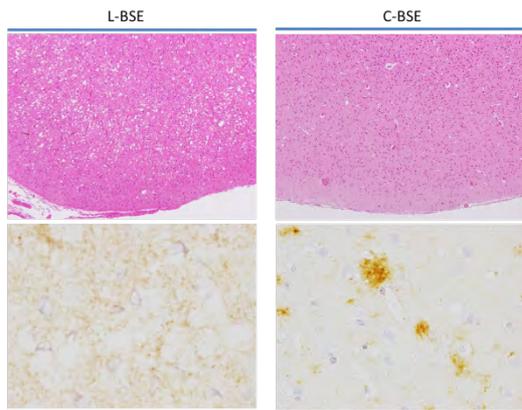
1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

図1



前頭葉のH&E染色（上段）およびプリオン染色（下段）

図2

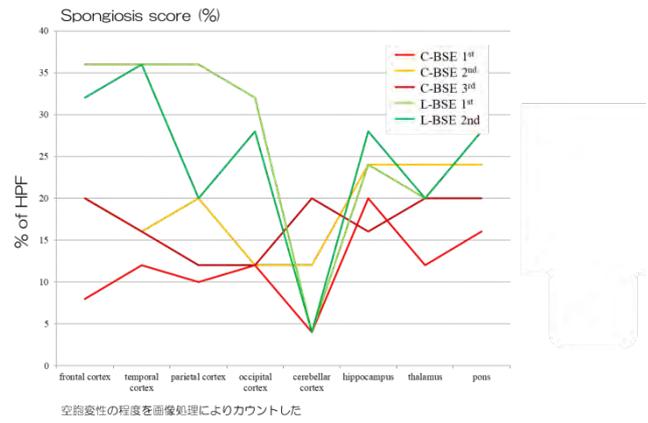


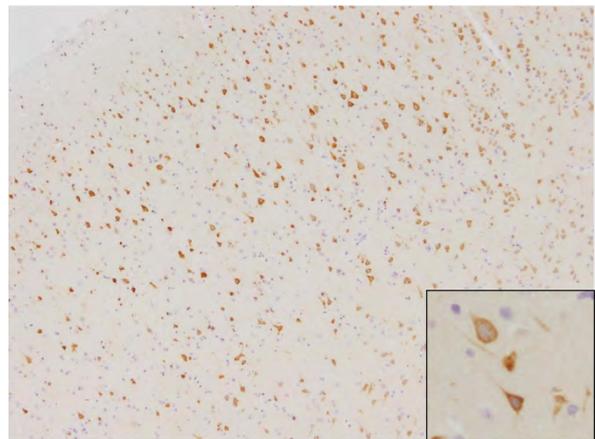
図3

Number of plaques / HPF(x100)

	C-BSE 1 st	C-BSE 2 nd	C-BSE 3 rd	L-BSE 1 st	L-BSE 2 nd
frontal cortex	8	11	20	ND	ND
parietal cortex	25	20	50	ND	ND
temporal cortex	5	10	6	ND	ND
occipital cortex	7	19	25	ND	ND
cerebellar cortex	4	3	3	2	1
hippocampus	5	5	1	ND	ND
thalamus	ND	ND	ND	ND	ND

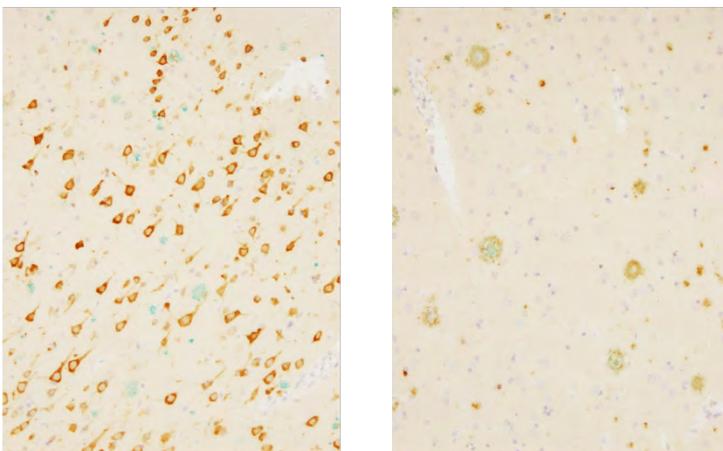
ND: not detected

図4



ヒト大脳皮質 3F4染色（ギ酸処理なし）

図5



正常型プリオンタンパク質とAβ 1-42の2重染色（茶：3F4、緑：Aβ 1-42）
コアを有するアミロイドフラーク形成部位ではPrP^{Sc}の発現が低下している

5. 光架橋反応による BSE プリオンの凝集体構造の解析

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）

研究要旨

プリオンは異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の凝集体から成る。PrP^{Sc} 凝集体は、他のアミロイド凝集体と同様にβシートに富むことが赤外分光分析から予想されているが、その不溶性やアスパラギン残基に付加しているN型糖鎖の多様性などのためにX線結晶解析法や核磁気共鳴法などのアプローチによる直接的な解析が難しい。これまでに PrP^{Sc} 凝集体の構造モデルが複数提唱されているが、実体は未だ不明である。本研究では光照射によるチロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp) 残基の架橋反応 (Chem Biol, 7: 697 (2000)) に着想を得て、光架橋物の解析から PrP^{Sc} 凝集体の構築について検討した。実験は C-BSE プリオンを解析対象として進め、PrP^{Sc} の少なくともアミノ基側 (ウシプリオン蛋白質のアミノ酸配列のおよそ 110~170 番目) の領域の Try もしくは Trp が PrP^{Sc} 単量体同士の境界面に位置するらしいことが示唆された。

また上記の研究とは別に、厚生労働省の TSE 確認検査において生化学検査 (ウエスタンブロット検査) の担当機関である北海道大学大学院獣医学研究院 獣医衛生学教室とウシ脳ホモジネートの試験検体を相互交換し、各々の機関で BSE 陽性・陰性を適正に判定できることを確認する精度管理試験を実施した。

A. 研究目的

プリオンの増殖機構やプリオン株の特性を理解する上で、PrP^{Sc} 凝集体の構造を知ることは極めて重要である。これまでに PrP^{Sc} 凝集体のモデル構造が複数提唱されているが、X線結晶解析法や核磁気共鳴法などの直接的な解析手法によるアプローチは容易ではなく、実体は未だ不明な点が多い。一方、間接的なアプローチとして、PrP^{Sc} 凝集体への各種の抗プリオン蛋白質抗体の反応性の検討からプリオン蛋白質のどのアミノ酸配列部分 (エピトープ) が凝集体の表面に露出しているかという点が検討されており、凝集体構造を予測する上で有用な情報を提供している (Kim *et al.*, Virology 320: 40 (2004)、Suzuki *et al.*, PLoS ONE 14: e0217944 (2019)、等)。

このような表面露出部位の探索とともに、他のアミロイド性蛋白質凝集体の生成過程と同様に、PrP^{Sc} 凝集体も PrP^{Sc} の単量体が会合・重合することで形成されると想定されることから、PrP^{Sc} 単量体のどの部分が隣接する PrP^{Sc} 単量体のどの部分と接しているのかを明らかにする意義も大きい。これまでに、①空間的に隣接する2つのチロシン (Tyr) 間のπ-π相互作用がβシート構造の

安定化に寄与すること (Partlow *et al.*, Biomacromolecules, 17: 3570 (2016))、②マウス・プリオン蛋白質の Tyr¹⁶⁹ をフェニルアラニンに置換すると PrP^{Sc} の proteinase K への抵抗性が減弱すること (Leske *et al.*, PLoS One, 12: e0170503 (2017))、などの報告がある。そこで本研究では蛋白質の新しい化学修飾方法として報告されている‘光照射による Tyr、トリプトファン (Trp) 残基の架橋反応’にアイデアを得て、プリオン蛋白質の Tyr や Trp に着目し、光架橋反応によって得られる架橋物の解析から PrP^{Sc} 凝集体の構築原理の検討を試みた。研究は、まず従来型 BSE (C-BSE) プリオンを対象として開始した。

B. 研究方法

1) 材料

本邦の食肉衛生検査所での BSE スクリーニング検査およびその後の確認検査で陽性判定された C-BSE 罹患ウシの脳を実験に供した。また、農林水産省許可の上で欧州から入手した C-BSE 罹患ウシの視床を実験に供した。

2) 光架橋反応

Dulbecco リン酸緩衝液 (PBS) を用いてホモジナイズしたウシ脳組織 (10%組織ホモジネート) を等量の 1% sarkosyl/1% decylmaltoside/0.2 M NaCl/0.1 M HEPES-NaOH (pH 7.4) と混合し、proteinase K (PK) (終濃度 50 μ g/mL) を添加して 37 $^{\circ}$ C で 30 分間酵素消化した。Pefabloc (種濃度 2.5 mM) を添加後、1/2 容量の ethanol を添加 (終濃度 33%) し、遠心操作 (4 $^{\circ}$ C、14,000 x g で 30 分間) により沈殿を回収した。この操作により、ホモジネート中の不要な成分をできるだけ除去した。沈殿を 0.5% sarkosyl/0.5% decylmaltoside を含む PBS に再懸濁し、光架橋実験に供した。光照射は先行文献 (Fancy *et al.*, Chem Biol, 7: 697 (2000)) に用いられた条件を参考にし、0.053% ammonium persulfate、0.113 mM Tris(bipyridine) ruthenium (II) chloride 存在下、450 nm LED 光の最適照射時間 (3sec~20sec) で行った。

3) SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング、PNGase F 処理

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングには、ThermoFisher Scientific 社の boltTM Bis-Tris ゲルを用いた。N 型糖鎖の切断・除去は、New England BioLabs 社の PNGase F を用い、メーカーのプロトコールに従った。

(倫理面への配慮)

人を対象とする医学系研究、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、動物実験、等の該当するものは本研究は含まない。

C. 研究結果

(1) 架橋物の初期解析

PK 消化後の C-BSE プリオン凝集体を光照射による架橋反応にかけた後、反応液中の PrP^{Sc} を SDS-PAGE/ウエスタンブロットにより分析した。プリオン蛋白質の中間部を認識する SAF84 抗体を用いて PrP^{Sc} を検出したところ、PrP^{Sc} の単量体に由来する 3 本の抗体陽性バンドの他に、検出バンドの泳動度 (分子量サイズ) から 2 量体ないし 3 量体に架橋された PrP^{Sc} と考えられる分子種が生成していた (図 1 A)。反応液を PNGase F とインキュベーションして PrP^{Sc} の N 型糖鎖を切断・除去してから SDS-PAGE/ウエスタンブロッ

ト分析にかけると、2 量体、3 量体、4 量体、および高度の多量体となった架橋物 (以下、架橋体とする) がより明確に判別できた (図 1 B)。

(2) 各種抗体の架橋体に対する反応性

次に、(1) と同様の SDS-PAGE/ウエスタンブロット分析を、以下 i、ii、iii のようにエピトープが異なる抗プリオン蛋白質抗体を用いて行った。その結果を図 2 に示す。

i. エピトープがプリオン蛋白質の N 側ないし中間部領域 (ウシプリオン蛋白質のアミノ酸配列のおよそ 110~170 番目のアミノ酸) にあると云われている抗体による検出:

各パネルの右側 2 レーン (光照射の無し・有り) を比較すると、エピトープが N 末領域にあると云われている抗体 (1E4、6G3、12F10) は、光照射の有無にかかわらず PrP^{Sc} の単量体に由来するバンドを明瞭に検出するが、光照射によって生成し、存在しているはずの架橋体を検出できない、あるいは微弱に検出できる程度、であることがわかった。

ii. エピトープがプリオン蛋白質の中間部領域ないし C 側領域 (ウシプリオン蛋白質のアミノ酸配列のおよそ 170~235 番目のアミノ酸) にあると云われている抗体による検出:

エピトープが中間部領域ないし C 末側領域にあると云われている抗体 (SAF84、F99/97.61) を用いた場合には、PrP^{Sc} の 2 量ないし 3 量架橋体と考えられる陽性バンドが検出された。併せて、単量体に相当するバンドも検出された。

iii. エピトープがプリオン蛋白質の C 末 (ウシプリオン蛋白質のアミノ酸配列の 236~239 番目のアミノ酸) にあると云われている抗体による検出:

Tyr²³⁶、Tyr²³⁷ を含む C 末端をエピトープとする 5G12 抗体を用いた場合、光照射によって PrP^{Sc} の架橋体のみならず、単量体に相当するバンドも検出されなくなった。

D. 考察

本研究では、脳ホモジネートを予め PK 消化にかけること、夾雑物 (正常型プリオン蛋白質

PrP^Cも含む)をできるだけ分解・除去してから光反応を行った。ここで使った PK 消化条件で処理した脳ホモジネートを本研究とは別途の近交系マウスを用いたバイオアッセイにかけて、マウスへの病原性が PK 消化の有無によらずにほぼ同質であることを確認している(分担研究者 未発表データ)。すなわち、PK 消化後の PrP^{Sc}凝集体は、PK 未処理の脳ホモジネート中の PrP^{Sc}凝集体の構築骨格を基本的に保持していると考え、実験を進めた。

用いた光反応は、ルテニウム錯体の酸化還元状態を利用して蛋白質の分子内あるいは分子間の近接する Tyr や Trp 間で架橋を生じさせる。架橋反応のメカニズムは Tyr や Trp のフェノール環やインドール環からの電子の引き抜きによるラジカル反応であると推測されているが、未だ判らない部分がある(Chem Biol, 7: 697 (2000))。SAF84抗体のエピトープはプリオン蛋白質の中間部領域と考えられており、このエピトープ領域には複数の Tyr が散在する。もし、「Tyr や Trp に架橋・修飾が起ると抗体への結合・反応が減弱する」ならば、ウエスタンブロット分析の結果(図1 A および 1 B)を見ると、SAF84抗体は PrP^{Sc}の単量体にも多量架橋体にも強く結合・反応しているので、SAF84抗体のエピトープに存在する Tyr は架橋・修飾が起きていないことになる。この結果の解釈として、以下の2つの可能性が考えられる。

- ・ SAF84抗体のエピトープに存在する Tyr はルテニウム錯体が接近しにくい(よって、ラジカル生成が起こりにくい)ような凝集体の内部に埋もれている。
- ・ 凝集体の表面に露出しているも、架橋反応の相手となり得るアミノ酸残基(Tyr, Trp など)が近傍に無い。

同様に、F99/97.61抗体でも PrP^{Sc}の2量ないし3量架橋体と考えられる陽性バンドが検出された(図2)ので、F99/97.61抗体のエピトープに局在する Tyr についても上の2つの可能性が考えられた。但し、この解釈は「Tyr や Trp に架橋・修飾が起ると抗体への結合・反応が減弱する」ことを前提としており、Tyr や Trp に架橋・修飾が起きていても抗体との結合・反応性が影響されない可能性もあるので、慎重に考えるべきであろう。

一方、エピトープが N 末領域にあると云われている抗体(1E4, 6G3, 12F10)を用いた場合には、光反応によって生成しているはずの架橋体が検

出されず(図2)、N末領域に点在する Tyr や Trp は光反応によって何らかの架橋・修飾が生じたことで抗体の結合が減弱しているのではないかと考えられた。つまり、(PK消化後のコア断片の)N末領域の Tyr や Trp は PrP^{Sc}単量体と単量体の境界域で近接し、凝集体の構築へ寄与しているのではないかと想像された。さらに、この領域はルテニウム錯体が接近できる程度に凝集体表面に露出しているのではないかと想像される。なお、1E4, 6G3, 12F10, SAF84, F99/97.61各抗体によって未架橋の PrP^{Sc}単量体のバンドが検出されている(図2)が、これは光照射強度を適度に調節して架橋が100%の収率で起きないようにしたためである(長時間かつ強力に光照射すると PrP^{Sc}は高度の架橋体となり、ウエスタンブロット上で SDS-PAGE ゲルの上端に相当する部分に唯一検出された)。

Tyr²³⁶, Tyr²³⁷を含む C 末端をエピトープとする 5G12抗体を用いたウエスタンブロットでは、PrP^{Sc}の架橋体のみならず、存在する単量体のバンドも検出されなくなった。単量体バンドが検出されないという事実の解釈は難しい。PrP^{Sc}単量体は存在するが、Tyr²³⁶, Tyr²³⁷(どちらか片方、あるいは両方)にラジカル反応によって架橋以外の修飾が起きた、あるいは、ペプチド結合を介して隣り合う Tyr²³⁶-Tyr²³⁷間で架橋が形成されたため、光照射後の反応液中の PrP^{Sc}単量体に 5G12抗体が結合できなくなった、という可能性が考えられるが、現時点ではよくわからない。架橋体が検出されないのは、そもそも単量体が検出されないからであろう。

今後の必須課題として、今回の実験では抗体のデータシートや文献(Féraudet *et al.*, J Biol Chem, 280: 11247 (2005))に記された抗体のエピトープ情報に従って解釈を進めたが、このエピトープ情報を実験的に自身で確かめる必要がある。また、Tyr, Trp 残基が修飾されると抗体の反応性が減弱することを実証する必要がある。

E. 結論

本年度に得られた実験データから、PrP^{Sc}の Tyr, Trp 残基に着目すると、少なくともアミノ基側(ウシプリオン蛋白質のアミノ酸配列においておよそ 110~170 番目)の領域の Tyr, Trp 残基は PrP^{Sc}単量体間の境界面に隣接して存在し、PrP^{Sc}の凝

集体構築に寄与しているのではないかと想像された。一方、170~235番目のアミノ酸領域にある Tyr (Trp は無い) については、光架橋反応が起きた証拠は得られなかったものの、凝集体の構築に何らかの役割を果たしている可能性は残る。これらの Tyr は凝集体内に埋まっているか、適当な架橋相手が近傍に無いのだろうと解釈した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara, K., Sato, Y., Yamakawa, Y., Hara, H., Tobiume, M., Okemoto-Nakamura, Y., Sata, T., Horiuchi, M., Shibata, H., and Ono, F. Tracking and clarifying differential traits of classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys. PLoS ONE, 14: e0216807, 2019
- 2) Okemoto-Nakamura, Y., Tanida, I., Yamaji, T., Hanada, K., and Hagiwara, K. A PRNP-disrupted human neuroblastoma cell line and its stable transformants expressing prion protein variants. BPB Reports, 2: 73-

79, 2019

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

<TSE 確認検査の精度管理試験について>

北海道大学大学院獣医学研究院 獣医衛生学教室より精度管理用の5検体(どれが陽性、陰性であるかを明かさない)をゆうパック便により受領した(病原体輸送にかかる規則を遵守した)。検体を検査要領に従って調製し、感度の精度管理試験(100 µg 組織等量で陽性ウシを摘発できるか)、および特異度の精度管理試験(5 mg 組織等量を用いて陰性ウシを疑陽性ではなくて正しく陰性と判定できるか)を実施した。試験結果を試験検体の配布元である堀内教授に報告し、感度・特異度ともに適正に管理されていることを確認した。

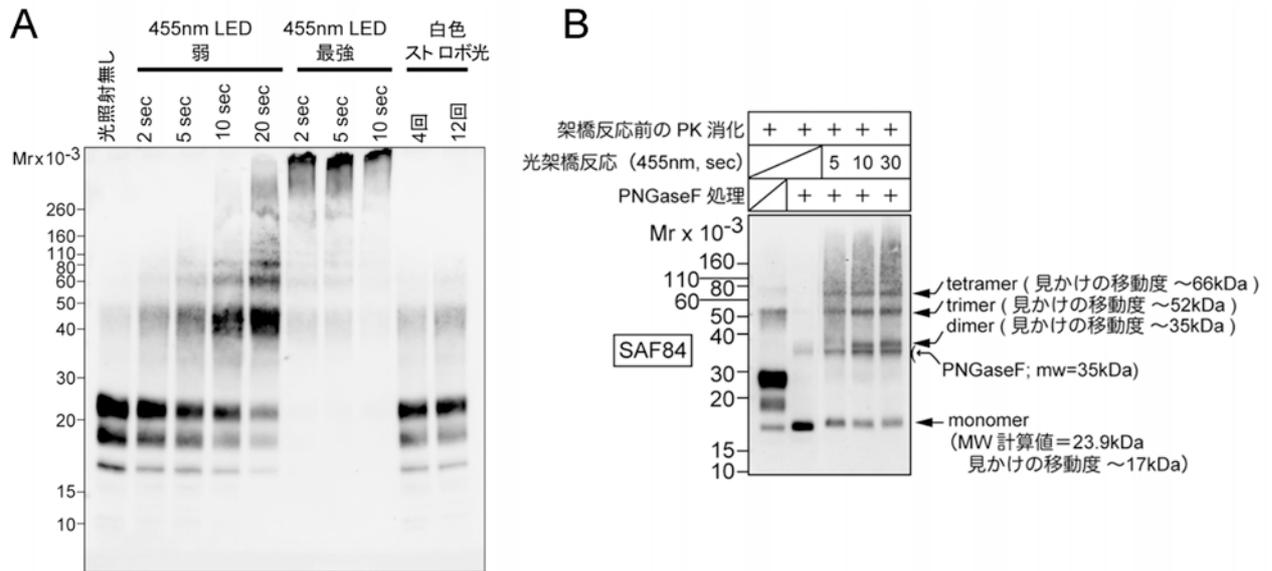


図1 架橋物の初期解析

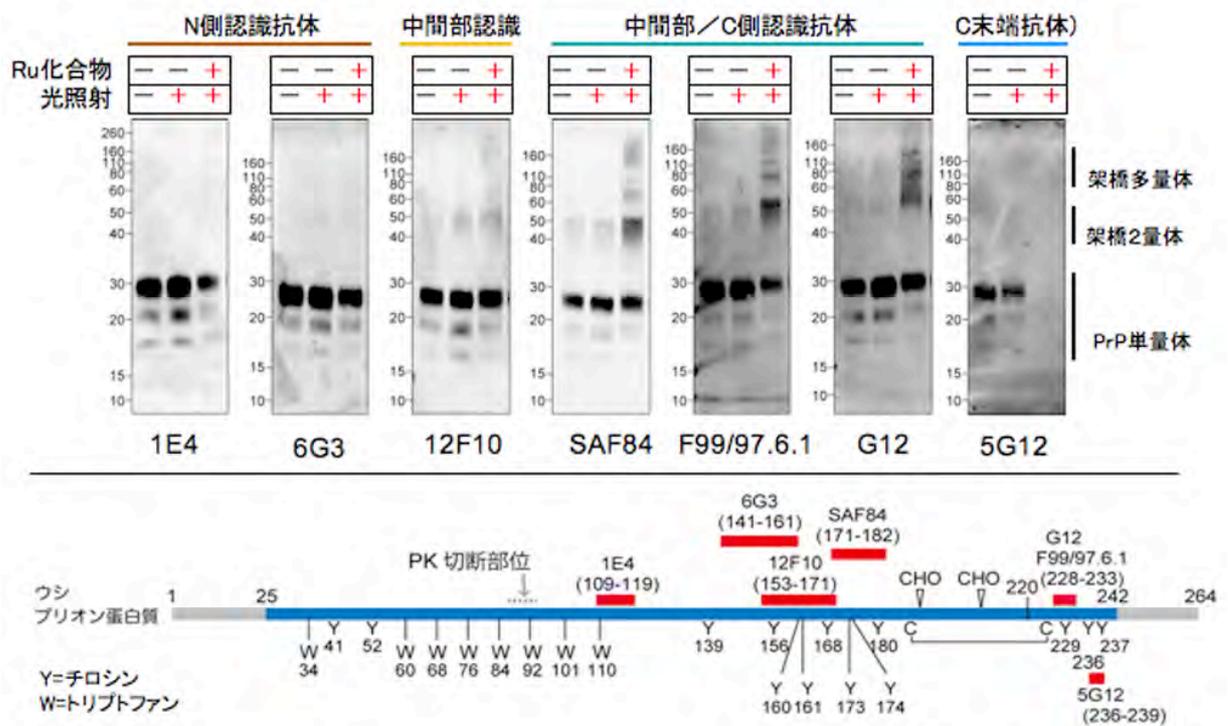


図2 各種抗体の架橋体に対する反応性

6. BSE, L-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

本研究では、BSE と非定型 BSE の関係を考察することを目的とし、BSE および非定型 BSE の一つである L-BSE を異種動物間で継代伝達した。プリオンが伝達された動物の病理学的特徴について比較することにより、種間伝達によるプリオン株の表現型がどのように変化するのか、あるいは維持されるのかを評価した。昨年度のハムスターへの伝達試験に引き続き本年度は、モルモットの結果が得られたのでその概要を報告する。BSE マウス/ハムスター株(BSE/mo/ham 株)および BSE スナネズミ/ハムスター株(BSE/ger/ham 株)の脳乳剤をモルモットに脳内接種し、病理学的検索を行った。比較対象として BSE 株接種モルモットと L-BSE 株接種ハムスター脳の病理学的検索を行った。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^{res} の沈着が確認され、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見られた。L-BSE 伝達ハムスターでは、脳全体にび慢性の PrP^{res} の沈着が認められ、微細顆粒状や血管周囲への小型斑状の沈着が特徴的であった。BSE/mo/ham 株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^{res} の沈着が確認され、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。また、BSE/ger/ham 株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、びまん性の沈着が確認されたが、特徴的な小脳病変は見られなかった。今回の結果よりプリオン株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。

A. 研究目的

BSE と非定型 BSE の関連についての研究では、イタリアで発生した L-BSE の 1 つであるアミロイド斑を特徴とする Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy (BASE) に関する報告がある。その研究では、BASE 発症牛由来の PrP^{res} の C57BL/6 マウスへの継代感染により、PrP^{res} の生化学的性状や沈着パターンについての表現型が BASE 感染マウスと定型 BSE 感染マウスで区別し難くなったことが報告されている。この同系マウスへの継代実験は、BASE 株が BSE 株に変換する可能性を示唆している。また、H-BSE 野外発生牛由来の PrP^{res} を C57BL/6 マウスに脳内接種する継代感染実験において、2 代目のマウスにおいて BSE の PrP^{res} に類似した生化学的性状の出現が認められており、これらの結果から、BSE は非定型 BSE に由来する可能性が示唆されている。

当研究室の先行研究では、本邦で発生した L-BSE はハムスターへ伝達性を示し、モルモットへの伝達性は認められなかった。一方、BSE はモルモットへ伝達性を示したが、ハムスターへの伝達は認められなかった。プリオン感染では、伝達可

能な種間においても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。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。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。L-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。

本研究は、BSE と L-BSE の関連に関しての考察を目的として、BSE 及び L-BSE を用いて、プリオン株の異種間伝達実験を計画した。げっ歯類を用いた本実験では、それぞれ伝達性を示した動物種から初代では伝達性を示さなかった動物種を含む異なる動物種へ PrP^{res} の交差実験を行い、そこで伝達性が成立した場合には、動物種を初代継代動物種に戻して次代へさらに感染実験を行う。その中で見られたプリオン伝達動物の病理像を、プリオン株と動物種の観点から特徴的な所見について比較することで、種間伝達によるプリオン株

の表現型の変化や一貫性を評価した。昨年度は BSE マウス馴化株、BSE スナネズミ馴化株のハムスターへの伝達性が確認されたのでそれらについて病理像を検索し、BSE と非定型 BSE の関連について考察した。本年度は、BSE プリオンをマウスに継代し、さらにハムスターに継代させた株(以下 BSE/mo/ham 株と記載)、BSE プリオンをスナネズミに継代し、さらにハムスターに継代した株(以下 BSE/ger/ham 株と記載)が、それぞれモルモットへの伝達性が確認されたのでそれらについて病理像を検索し、BSE と非定型 BSE の関連について考察したので報告する。

B. 研究方法

1) 供試動物及び接種材料

モルモット (Hartley) 8匹とハムスター(Syrian)2匹を使用した。接種材料は、BSE ウシ(BSE/JP4)由来の BSE 株をマウスに接種し継代したものを BSE/mo 株とし、それをハムスターに継代した BSE/mo/ham 株と、同様にして BSE をスナネズミ、ハムスターに継代した BSE/ger/ham 株を用いて作製した 10%脳乳剤入り PBS を用いた。それぞれの株をモルモット 2 匹ずつに投与した。

比較対象としてモルモット 4 匹に BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株を、ハムスター 2 匹に L-BSE ウシ (BSE/JP24) 由来の L-BSE ハムスター馴化株 2.5%脳乳剤を接種した。異種間伝達実験の概要については、Fig. 1 にまとめた。

2) 病理学的検索

接種動物は、沈鬱状態や歩様のふらつき、起立困難などの臨床症状が見られる病末期に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 μm パラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE)染色を行なった。免疫組織学的検索では、一次抗体として抗 PrP^{res} マウスモノクローナル抗体 12F10 抗体と抗 PrP^{res} ウサギポリクローナル抗体 B103 抗体を用い、二次抗体にはそれぞれ HRP 標識マウス抗体 (Dako Envision Kit, DAKO, U.S.A)、HRP 標識ウサギ抗体 (Dako Envision Kit, DAKO, U.S.A)を用いた。12F10 抗体はモルモット、B103 はハムスターの組織の免疫組織学的染色に用いた。PrP^{res} の免疫活性の賦活化には 135DWHa 法を用いた。また、PrP^{res} 沈着と神経細胞の関連を比較するために、アストログリアを標識する抗 GFAP ポリクローナル抗体を用いた。

(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

1) 臨床症状および肉眼所見

BSE/mo/ham 株伝達モルモット、BSE/ger/ham 株伝達モルモットでは各 2 匹中 2 匹で被毛粗剛や沈鬱、歩様異常などの症状が見られた発症個体について病末期までの平均日数を比較に用いた BSE 伝達モルモット、L-BSE 伝達ハムスターと併せ Table 2 に示した。剖検時、肉眼的に脳外観および矢状断面に著変は認められなかった。

2) 組織学的検索および免疫組織学的検索

BSE 伝達モルモットでは、大脳および小脳皮質、脳幹部において神経網や神経細胞細胞質内に空胞変性が確認された。特に、間脳と海馬において強い変性が認められた。小脳では、顆粒層の減数と分子層の菲薄化が認められ、それによる小脳の萎縮が顕著であった(Fig. 2)。大脳皮質軟膜下への沈着は認められなかった(Fig. 3)。また、脳全体において、抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色によってプラーク状や微細顆粒状、放射状、びまん性の PrP^{res} 沈着が確認された。抗 GFAP を用いた免疫染色では、間脳や小脳において顕著な萎縮が見られた部位に一致して、グリアの腫大及び増生による重度のグリオシスが認められた。L-BSE 伝達ハムスターでは、大脳および脳幹部において神経網や神経細胞細胞質内に空胞変性が確認された。また、小脳皮質を除く脳全体において、抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色によって微細顆粒状、血管や神経細胞周囲への小型斑状やび慢性的 PrP^{res} の沈着が確認された(Fig. 2)。さらに、大脳皮質軟膜下において PrP^{res} の沈着が認められ、海馬へのび慢性的顕著な沈着も確認された(Fig. 3)。BSE/mo/ham 株伝達モルモットでは、大脳および小脳、脳幹部において神経網や神経細胞質内に空胞変性が確認された。小脳では BSE 伝達モルモットと同様に顆粒層の減数と分子層の菲薄化が見られた(Fig. 2)。また、抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染色によってプラーク状、放射状、微細顆粒状やび慢性的 PrP^{res} の沈着が確認された(Fig. 3)。PrP^{res} の沈着の程度は、海馬においてやや強い陽性を示した。抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色では BSE 伝達モルモットと同様に小脳萎縮部に顕著なグリオシスが見られた。BSE/ger/ham 株伝達モルモットでは、大脳および小脳皮質、脳幹部において神経網や神経細胞質内に空胞変性が確認された。また、小脳皮質を除く脳全体にて、抗 PrP^{res} 抗体を用いた免疫染

色によってブランク状、放射状、微細顆粒状やび慢性の PrP^{res} の沈着が確認された(Fig. 2)。PrP^{res} の沈着の程度は、大脳、間脳においてやや強い陽性を示し、大脳皮質軟膜下への沈着も見られた(Fig. 3)。

BSE 伝達モルモット、BSE/mo/ham 株伝達モルモット、BSE/ger/ham 株伝達モルモット、L-BSE 伝達ハムスターにおける空胞変性・PrP^{res} 沈着とその程度は Table 1 に示した。

D. 考察

BSE プリオン株は、ハムスターには伝達性を示さないが、マウスおよびスナネズミを経由することでハムスターへの伝達性を示す。さらに今回の研究により、BSE/mo/ham 株と BSE/ger/ham 株のモルモットへの伝達性が確認された。

本実験では、BSE と L-BSE が牛以外の異種動物に伝達され、それがさらに牛に伝達された際に、その牛が BSE の特徴あるいは L-BSE の特徴（表現型）を示す可能性を検証している。BSE 伝達モルモットに特徴的にみられた小脳皮質の顆粒層の減数と分子層の菲薄化が BSE/mo/ham 株伝達モルモットでみられたが、この特徴は BSE/ger/ham 株伝達モルモットではみられなかった。一方、BSE 伝達モルモットではみられず、L-BSE 伝達ハムスターに特徴的な大脳皮質軟膜下への PrP^{res} の沈着が、BSE/mo/ham 株伝達モルモットおよび BSE/ger/ham 株伝達モルモットではみられた。このことから病理学的特徴が動物種に依存しているとは考え難かった。一方、BSE 伝達モルモット、BSE/mo/ham 株伝達モルモット、BSE/ger/ham 株伝達モルモットそれぞれの組織学的特徴が一致していないことは、プリオン感染動物の病理学的特徴がプリオン株に依存するという考え方に矛盾しない。接種された BSE プリオンがマウス、スナネズミ、ハムスターに継代されることで異なる株として同一動物種に異なる表現型が生じたと考えられた。また、BSE/mo 株伝達ハムスターと BSE/ger 株伝達ハムスターの組織像が一致していなかったことも、動物種以上にプリオン株が影響するという考えを補強すると考えられた。

BSE 感染牛では主に脳幹部や視床に PrP^{res} の沈着がみられたのに対して、L-BSE 感染牛では大脳皮質で主にみられ、小脳における PrP^{res} 沈着パターンや好発年齢も大きく異なることが報告されている。一方、実験動物では、C57BL/6 マウスへの BASE 発症牛由来の PrP^{res} の継代感染を通し、PrP^{res} の生化学的性状や沈着パターンについての表現型が BASE 感染マウスと定型 BSE 感染マウスで区別し難くなったことが報告されている。こ

れは継代を重ねたことで性状が変化したためと考えられ、直接動物種による影響とは言い切れないとされている。これらのことからプリオン株によって、PrP^{res} の変化のしやすさ、さらに PrP^{res} の表現型の変化の方向性、すなわち BSE の表現型を発現するか、または新たな表現型を発現するようになると考えられた。種間伝達においてプリオン株の生物学的・生化学的性状の変化あるいは維持の程度を決めるメカニズムについての詳細は不明であるが、今回得られた結果より、BSE 伝達モルモット、BSE/mo/ham 株伝達モルモット、BSE/ger/ham 株伝達モルモットで比較したときに、その病理学的特徴が一部では維持されているものの、同動物種間で完全な一致が見られなかったことから、性状の変化はよりプリオン株に依存していると結論された。

BSE の起源や L-BSE との関連性は解明されておらず、伝達過程における性状の変化のメカニズムも不明な点が多い。プリオン株が異なる動物種で継代されることにより、表現型がどのように変化するかを検討することにより、その一端が明らかになると考えられる。

E. 結論

BSEmo/ham 株、BSEger/ham 株はモルモットへ伝達し、その病理学的特徴は、動物種とプリオン株の双方に影響を受けているものの、その性状の変化や維持の程度（表現型）はプリオン株に大きく影響されることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakaguchi S, Shintani S, Kamio K, Sekiya A, Kato S, Muroi Y, Horiuchi M, Furuoka H. Selective neuronal vulnerability is involved in cerebellar lesions of Guinea pigs infected with bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions: Immunohistochemical and electron microscopic investigations. *Neuropathology*, 2019 Dec 2. doi: 10.1111/neup.12613.

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

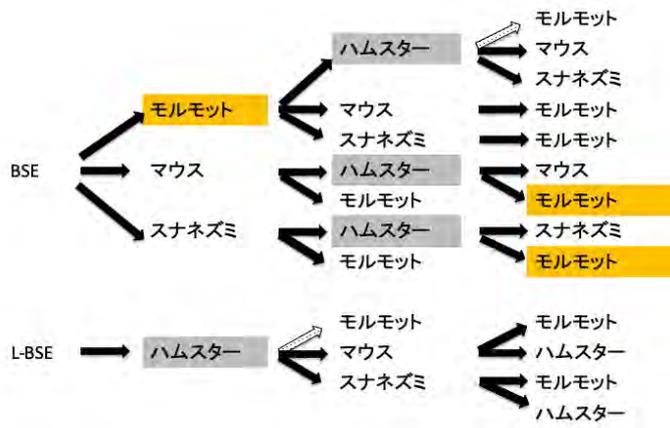


Fig. 1. 伝達試験の概要。灰色部分は昨年度実施分。黄色部分が本年度実施動物分を示す。本年度の結果として、BSE/mo/ham 馴化株, BSE/ger/ham 馴化株からモルモットへの伝達が可能であった。

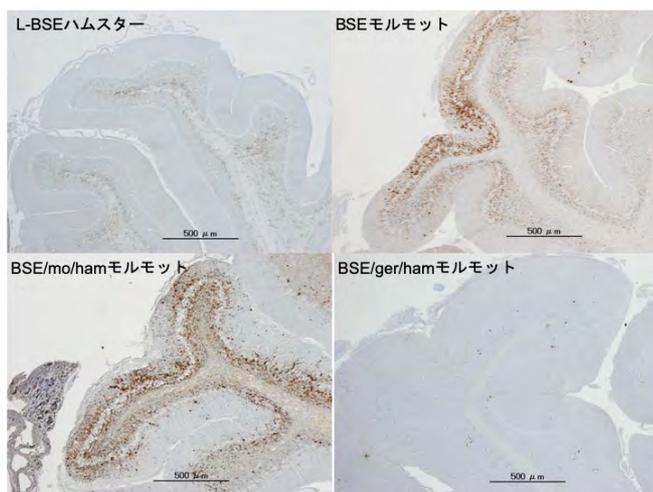


Fig. 2. 小脳におけるプリオンの沈着パターンを示す。BSE モルモットと BSE/mo/ham 伝達モルモットに特徴的なパターンがみられる。

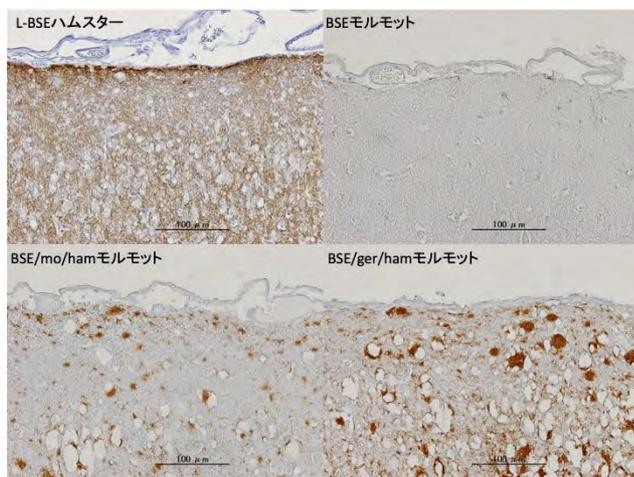


Fig. 3. 大脳においては、いずれも異なる沈着パターンをします。

	L-BSE/ham	BSE/gu	BSE/mo/ham ¹⁾	BSE/mo/ham/gu	BSE/ger/ham	BSE/ger/ham/gu ²⁾
大脳皮質	+	-	-	++	-	++
海馬	++	+	++	+	++	+
小脳皮質萎縮	-	+++	+	+++	-	-
血管・神経 周囲	+	-	-	-	+	-
ブランク状	-	+	-	+	-	++
放射状	-	+	-	-	+	-
微細顆粒状	+	+	+	+	+	+
び慢性	+	+	+	+	+	+

Table. 1. プリオン沈着部位および沈着パターンのまとめ。BSE 伝達モルモットに特徴的な小脳皮質の萎縮が、BSE/mo/ham 伝達モルモットに観察される。

7. 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上級研究員

研究協力者 岩丸 祥史 (農研機構動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域)

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)

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ではプリオンが検出される。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目的とする。H-BSE 実験感染牛の末梢神経系や筋肉組織、唾液腺をウシプリオン蛋白質発現トランスジェニックマウスの脳内に投与し、プリオン感染実験をおこなった。その結果、末梢神経系や筋肉の組織にプリオン感染性が確認できた。マウスの潜伏期間から末梢神経系組織と筋肉の H-BSE プリオン感染価は、中枢神経系の脳と比べて、それぞれ 1/3,000 と 1/20,000 より低いことが明らかとなった。

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目的とする。

平成 30 年度には、ウシ PrP 発現トランスジェニックマウス (TgBov) を用いた感染実験で末梢神経系組織ならびに一部の筋肉にプリオン感染性が認められ、本年度はほかの組織の感染実験を継続し、H-BSE 感染性の有無を検討した。

B. 研究方法

H-BSE を実験感染したウシ (発症期) の末梢組

織 12 箇所 [末梢神経系組織：迷走神経 (頸部と胸部)、副腎；筋肉組織：最長筋、大腰筋、上腕三頭筋、半腱様筋、大腿四頭筋、咬筋；唾液腺：舌下腺、耳下腺、下顎腺] を、10% (w/v) の組織乳剤に調整した。10%組織乳剤の 0.02 mL をそれぞれ TgBov の脳内に投与した (平成 29 年度)。

全てのマウスは週 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が検出されたマウスを 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。

プリオン感染価を算出する用量-反応曲線 (平成 29 年度) は、次式を用いた。

$$y = 19.32 + (-0.046) \times X_1 \quad (1)$$

$$y = 4.19 + (-0.0054) \times (X_2 - 329) \quad (2)$$

ここで、 y は感染価 $\log LD_{50}/g$ 、 X は潜伏期間 (日) で、 $X_1 \leq 329 < X_2$ を示す。

(倫理面への配慮)

本実験は農研機構動物衛生研究部門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）」を遵守した。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）」を遵守した。

C. 研究結果

H-BSE 実験感染ウシ組織を脳内投与した TgBov への感染実験の結果を図に示す。末梢神経系組織を投与した TgBov は、迷走神経頸部で 4/5 や副腎で 4/4 の感染率で、その潜伏期間の平均はそれぞれ 437 ± 66 日と 408 ± 9 日であった。可食部筋肉の最長筋、半腱様筋、大腿四頭筋の投与群では、429 日以上潜伏期間で BSE 感染陽性 TgBov が確認された。そのほかの投与群では、接種後 700 日までで観察したが、いずれの TgBov も BSE に感染しなかった。

TgBov の潜伏期間をもとに用量-反応曲線で各組織の感染価を算出した（表）。迷走神経頸部と副腎のプリオン感染価はそれぞれ $10^{3.8} \text{ LD}_{50}/\text{g}$ と $10^{3.9} \text{ LD}_{50}/\text{g}$ で、中枢神経（ $10^{7.4} \text{ LD}_{50}/\text{g}$ ）と比べて $10^{-3.5}$ 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 $10^{3.1} \text{ LD}_{50}/\text{g}$ 、 $10^{3.0} \text{ LD}_{50}/\text{g}$ 、 $10^{3.0} \text{ LD}_{50}/\text{g}$ の感染価が蓄積していた。

D. 考察

TgBov を用いた感染実験で、H-BSE 実験感染牛の末梢神経系組織や筋肉にプリオンが分布することを確認した。中枢神経の脳と比べて、副腎や頸部迷走神経に分布するプリオンは、1/3,000 より少なく、可食部である筋肉でも 1/20,000 より少ない。これらの結果が H-BSE の自然発症ウシにおけ

るプリオンの体内分布を反映するか否かは不明である。また、いまだ症例の報告はないが、飼料等を介した H-BSE の自然感染ウシでも反映しているかは不明である。今後、様々な H-BSE 感染ウシのプリオン組織分布を検討することが必要である。

E. 結論

TgBov を用いた感染実験で、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を明らかにした。中枢神経系の脳と比べて、食品に含まれる末梢組織に分布するプリオン感染価は、1/3,000 より低いことが示された。

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

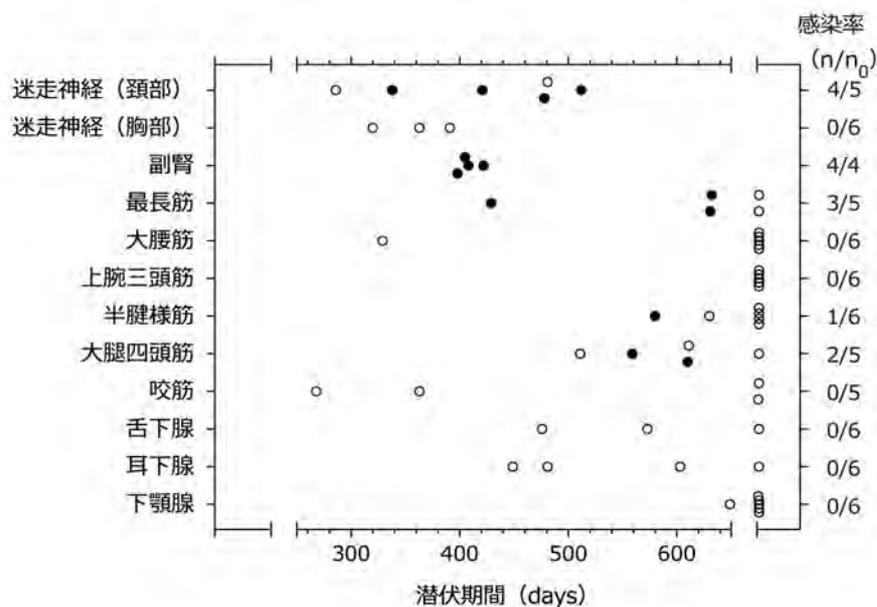


図 1. H-BSE 実験感染ウシの末梢組織を用いた TgBov へのプリオン感染実験

H-BSE 実験感染ウシの末梢神経系組織（迷走神経（頸部）ならびに副腎）、筋肉（最長筋、半腱様筋、大腿四頭筋）を脳内投与した TgBov では BSE に感染した個体（●）が認められた。それ以外の組織では BSE に感染しなかった個体（○）のみであった。

表 1. H-BSE 実験感染ウシにおけるプリオンの組織分布

H-BSE 実験感染牛の組織	プリオン感染価 log LD ₅₀ /g
中枢神経系（脳）	7.4
迷走神経（頸部）	3.8
迷走神経（胸部）	-
副腎	3.9
最長筋	3.1
大腰筋	-
上腕三頭筋	-
半腱様筋	3.0
大腿四頭筋	3.0
咬筋	-
舌下腺	-
耳下腺	-
下顎腺	-

感染性の検出限界以下を“-”で示す。

8. わが国のと畜場ならびに大規模食鳥処理施設における HACCP システム 評価法の実証試験

分担研究者	鎌田 洋一	甲子園大学・栄養学部 教授
	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 教授
	山崎 剛士	北海道大学大学院・獣医学研究院 助教
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 部長
研究協力者	堀内基広	(北海道大学大学院・獣医学研究院)
	佐々木貴正、山本詩織、町田李香、中山達哉	(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)
	豊福 肇	(山口大学 共同獣医学部)
	柳澤幸雄、森田聡志	(日本大学・生物資源科学部)
	重松幸正、小原和仁	(公益社団法人 全国食肉学校)
	猪子理絵、北山友子	(北海道帯広食肉衛生検査所)
	林 健太郎	(青森県十和田食肉衛生検査所)
	藤原日出子、梶田弘子、稲森久展	(岩手県食肉衛生検査所)
	白岩利恵子、高田清己、大池裕治	(岩手県獣医師会食鳥検査センター)
	黒川真実子、小菅達也、樋熊原野	(富山県食肉衛生検査所)
	松井絵美、齊藤こずえ、富田六郎太、唐沢一宏	(新潟県長岡食肉衛生検査センター)
	清水秀樹、山田沙苗、八重森恵子	(山梨県食肉衛生検査所)
	安江智雄、塚本真由美、荻谷俊宏	(岐阜県飛騨食肉衛生検査所)
	吉岡拓治、横山 泰、小川雅弘、明石 誠、仁和岳史、堀畑貴子、神尾隆昌、麻野はる香	(千葉県東総食肉衛生検査所)
	松田 智行	(茨城県西食肉衛生検査所)
	葛岡功弥子、森本賢治、岡田麻美子、安岡知未、牧野江梨子、河合浩二、山内俊平	(豊橋市食肉衛生検査所)
	神田 郁、戸嶋章湖、坂江真由美、鈴木維時、占部晋一朗、濱中幸裕	(兵庫県食肉衛生検査センター)
	原田一郎、吉岡城拓	(兵庫県但馬食肉衛生検査所)
	高田信子、南 優姫、松崎道哉	(神戸市食肉衛生検査所)
	石丸 歩、藪内園子、富田幸子、大石克己	(徳島県食肉衛生検査所)
	安達俊輔、亀田真吾、黒崎守人、藤田葉子、佐々木真紀子	(島根県食肉衛生検査所)
	庄嶋貴之	(福岡市食肉衛生検査所)
	眞鍋千穂	(宮崎県高崎食肉衛生検査所)
	弓削耕一郎、竹内僚子、岩切 章	(宮崎県都農食肉衛生検査所)
	藤本早苗	(宮崎県小林食肉衛生検査所)
	内海優子	(宮崎県日向食肉衛生検査所)
	土井朋子、小出朋子、川畑仁志、仲町康正	(鹿児島県鹿屋食肉衛生検査所)
	村田 香	(鹿児島県末吉食肉衛生検査所)
	郡山芳昭	(鹿児島県志布志食肉衛生検査所)
	鳥丸安敬、堀 豊、木下 武、湯之原義弘	(鹿児島県知覧食肉衛生検査所)

富永正哉、大城哲也（沖縄県中央食肉衛生検査所）
馬場俊行（スターゼン株式会社）
野市哲也、又間信人（スターゼンミートプロセッサー株式会社）
小林光士、下出敏樹、永瀬正幸、水上和則、住奥寿久、水口匡敏
（JA 飛騨ミート）
中島和英（東京食肉市場株式会社）

研究要旨

わが国のと畜場・大規模食鳥処理施設への HACCP システムの制度化をふまえ、わが国の現状に適した内部・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、わが国で導入しやすい拭取り法による検証法プロトコルを完成させ、牛処理場 8 カ所、豚処理場 10 カ所、並びに食鳥処理施設 4 カ所、合計 22 カ所のと畜場及び食鳥処理施設で同プロトコルを試行した。拭取法は多くの自治体で採用可能と思われた。しかし、いくつかの問題点を反映させたプロトコルの改善が必要と思われた。牛・豚・食鳥の拭取法を用いた一般細菌数や腸内細菌科菌群数による施設の衛生状況を評価する際には、ノンパラメトリック検定を使用する必要があると考えられた。

米国・EU におけると畜場・食鳥処理施設の内部検証、外部検証では、わが国で実施している拭取法は実施しておらず、切除法を採用している。わが国においてもと畜場・食鳥処理施設への HACCP 導入にあつては、切除法を検討する必要があると思われた。そこで平成 30 年度には拭取り法と切除法の比較を行い、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、牛・豚では一般細菌数、食鳥では一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群数についてそれぞれ高値を示し、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望ましいと考えられた。

令和元年度は、牛及び豚枝肉からの切除片(25 cm²)、及び食鳥とたい首皮(25 g)を採取部位としたプロトコルを試行した。牛枝肉では「ともばら」「頸部」「胸部」を、豚枝肉は「胸部」を検討した。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が可能と考えられた。今後、実際の検証試験の実施には、①1 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。

本研究の成果は、令和 3 年度には本格的に制度化される、と畜場および大規模食鳥処理施設の HACCP システムを外部検証する手法の科学的根拠を提供するものとする。

A. 研究目的

HACCP は「危害要因分析・重要管理点」と和訳され、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の地位を確立し、実際に欧米を始め多くの国で HACCP の導入が進んでいる。食肉においては、と畜場法施行規則を平成 26 年 6 月に改正し、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 の普及が図られてきた。平成 30 年

6 月に食品衛生法等が改正され、食肉・食鳥肉事業を含むあらゆる食品業種に HACCP 導入が制度化されることの方針が明確になった。

HACCP の制度化にあつては、HACCP 導入による「食肉・食鳥肉の安全性の向上」効果の評価するための科学的手法の確立が必須となる。わが国のと畜場・大規模食鳥処理施設の HACCP 制度化をふまえ、国際的協調性を持ちながらかつわが国の現状に適したと畜場・食鳥処理施設の内部・外部検証システムを構築する必要がある。欧米では細菌検査を用いた 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及び食鳥処理施設の現状に即した手法の確立が期待される。平成 29 年度から開始した本研究は、わが国のと畜場（牛、豚）、および食鳥処理施設（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し、同法の国内への普及、HACCP の導入効果の確認、HACCP システムの妥当性評価をと畜場・食鳥処理施設で実施し、食肉領域における衛生管理の向上につなげることを目標とした。平成 29 年度では、わが国において、牛、豚、および食鳥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施設（2 カ所）においてと体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、採材する部位、および採材するときの工程、ならびに各種の衛生指標細菌について検討し、その結果を科学的根拠とし、拭取り法によるプロトコールを作成した。平成 30 年度は作成したプロトコールについて、各自治体の協力を得て、牛 8 施設、豚 10 施設、食鳥 4 施設で試行した。試行にあたっては、作成したプロトコールの理解の容易さ、操作性、記録の容易さを検証するため、プロトコール試行の前後でアンケートをとり、プロトコールの質の向上を目指した。試行したプロトコールを資料として付する（資料 1, 2）。令和元年度においては、検体採取に平成 30 年度に検討した切除法を導入し、その適応の科学的根拠を得るべく検証試験を行った。切除には牛豚枝肉および食鳥とたいの損傷が伴う。また、切除操作の難易度も重要な要因となる。全国の食肉衛生検査所および食肉・食鳥肉事業者の協力のもと、本試験を遂行した。

B. 研究方法

①と畜場・大規模食鳥処理施設 HACCP システム評価法の検証試験及び国内基準値設定の検討

1) 検査対象施設

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）、ならびに大規模食鳥処理施設（12 施設）を対象とした。各施設の年間処理頭（羽）数、ならびに検証プロトコール施行試験実施時点における HACCP 導入状況を表 1 に示す。

2) 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）の改善

平成 29、30 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令和元年度実施依頼プロトコール」案を作成した（資料 1）。本案に従い、牛豚は本冷蔵庫搬入前にともばら（牛）、胸部（豚）の 5 cm x 5 cm (25 cm²) を切除法により採材した。食鳥は本冷却後に首皮または胸皮計 25 g を切除法により採材し、5 羽分を纏めて 1 検体とした。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）。

切除法により得られた材料は、90 ml の PBS 等の希釈液を加えたストマッカー袋に回収し、1 分間、ストマッカー処理を行った後、10 倍階段希釈液を作成した。

「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に準じて、各指標細菌数を計測した。すなわち、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、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、EB プレートは 37℃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。

3) 事後アンケートの実施

「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」の実施に当たり、研究協力機関、ならびに研究協力施設に対して事前アンケートを実施し、実施施設名、対象畜種、施設規模（牛および豚年間処理頭羽数）、HACCP 導入状況等の情報を収集した（表 1）。さらに、「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」の試行試験実施後に、事後アンケートを実施し、試験実施内容を含む当該プロトコールを実施した上での所感を調査し、それぞれ問題点、改善点、その他意見を収集した。

4) 統計解析

HACCP 導入状況別、年間処理頭羽数別、および各施設別の一般細菌数、腸内細菌科菌群数の比較には、Anderson-Darling 検定による正規性の検定を行った。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。さらに、各施設における一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数の「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」および「標準偏差」の各値を算出した。また、各使用者が今後、解析を行う際の一助とするため、FAO/WHO微生物専門家会合（JEMRA）が作成したオープンソースの解析モデル「微生物のサンプリングプランの影響を推定するツール：ロット別検査」（<http://www.fstools.org/sampling/>）の使用方法に関する文書を和訳した。

5) 国内基準値設定の検討

国内のと畜場および大規模食鳥処理施設のHACCPシステムが適切に実施され、衛生管理の向上を推進していくためには、十分な検体数を基に回収された細菌数データを統計学的に処理することにより得られた統一的な国内基準値を設定する必要がある。

と畜場や食鳥処理施設におけるHACCPシステムが制度化されている米国やEUにおいては、各関係規則にて枝肉や食鳥とたいに適用する基準値が示されている。本研究班においては、これらの海外の基準値の設定方法を参考にして、我が国で適用が可能な基準値の設定を検討した。

②評価法の改善に関する検討(1)：採材面積の縮小の可能性に関する検討

1) 検査材料

令和元年9月9日、(公社)全国食肉学校の冷凍庫に保管されている枝肉のうち牛3頭、豚4頭の左右の枝肉を用いた。

2) 採材方法

牛は臀部、ともばら、胸部、豚は臀部、胸部、頸部の3か所の100 cm² (10 cm×10 cm)と25 cm² (5 cm×5 cm)を切除法により採取した。切除法は、切除面積が10 cm×10 cmのステンレス版を用いた。ステンレス板を枝肉と平行になるように当て、手術用滅菌メスで縦・横10 cmの切除枠に沿って浅くメスを入れた後(約2 mm)、ステンレスの板をはずし、滅菌ピンセットとメスで表面を切除した。10 cm×10 cm×約2 mmの切除検体は、ストマッカー袋に入れ、計量した。その後、隣接する場所に、切除面積が5 cm×5 cmのステンレス版を枝肉と平行になるように当て、手術用滅菌メスで縦・横5 cmの切除枠に沿って浅くメスを入れた後(約2 mm)、ステンレスの板をはずし、滅菌ピンセットとメスで表面を切除した。5 cm×5 cm×約

2 mmの切除検体は、ストマッカー袋に入れ、計量した。

3) 衛生指標細菌数の測定

①2)の切除法に示す方法と基本的に同様であるが、10 cm×10 cm×約2 mmの切除では、検体をストマッカー袋に入れ、計量後、90 mlのPBSを加え1分間、ストマッカー処理を行った。5 cm×5 cm×約2 mmの切除法では、検体をストマッカー袋に入れ、計量後、22.5 mlのPBSを加え1分間、ストマッカー処理を行った。その後、適宜、PBSを用いて10倍階段希釈を実施し、一般細菌数を計測した。細菌培養については2)に上述した方法により実施した。

4) 統計解析

採取面積別の単位面積(1 cm²)あたりの一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の比較には、Anderson-Darling検定による正規性の検定を行った後、Mann-Whitney U検定を行った。本研究では、ACプレート上で1集落でも検出されたものは1集落として算出した。すなわち、例として5 cm×5 cm×約2 mmの検体の重量が10 gであって、それに22.5 ml加え、ストマッカー処理した希釈原液を各々2枚のペトリフィルムに1 mlずつ加えて培養した場合に、1枚が1集落、他の1枚が0集落の場合は0.65 cfu/cm²とした。

③評価法の改善に関する検討(2)：新規採材部位としての牛頸部の検討

1) 検査材料

牛を対象とすると畜場5施設を対象とした。各施設につき、原則5本の枝肉について、予備冷蔵から本冷蔵に入る時点、すなわち本冷蔵庫搬入直前又は、本冷蔵に入った直後で、と体の温度が低下する前の枝肉を対象とした。

2) 採材方法

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：図1、2)を対象とし、切除面積が5 cm×5 cmのステンレス版を用いて切除法を実施した。ステンレス板を枝肉と平行になるように当て、手術用滅菌メスで縦・横5 cmの切除枠に沿って浅くメスを入れた後、ステンレスの板をはずし、滅菌ピンセットとメスで表面を切除した。

3) 衛生指標細菌数の測定

①と同様にペトリフィルムを用いて、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を計測した。

④評価法の改善に関する検討(3)：新規採材部位としての牛胸部の検討

1) 検体材料

本年度の検討では、枝肉を切除し、切除片の培養が基幹方針となっている。切除に伴い、と体の損傷は避けることができず、と体の食肉としての価値の減弱を最小化する必要があり、切除部位についてより多くの選択肢があることが望まれる。牛枝肉(n=30)からの採材部位として、胸部脂肪部分について検討した(図3)。切除面積は25 cm² (5 cm x 5 cm)で、切除はこれまでの記述と同様に行った。

2) 衛生指標細菌数の測定

上述の方法に準じて衛生指標細菌数を計測した。

⑤と畜場・大規模職長処理施設 HACCP システムの衛生管理状態を評価する手法としてのムービング・ウインドウに関する調査

HACCP システムを評価するにあたっては、例えば1年間のある時期に一度の試験を実施し、システムを評価するより、年間を通じて、あるいは、HACCP システム導入後継続的に、評価がなされることが望ましい。この発想を実現するのが、“ムービング・ウインドウ Moving Window”である。同評価法について、文献調査を行った。

C. 研究結果

①と畜場・大規模食鳥処理施設 HACCP システムの評価法の試行状況及び国内基準値設定の検討

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、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パーセントイル(中央値)」「80パーセントイル」「98パーセントイル」、並びに「標準偏差」の各値を求めた。結果を表2~7に示す。

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。

まず、EU については、EC 規則(2073/2005)にお

いて、EU 域内のと畜場、食鳥処理施設が HACCP の実施状況を微生物学的に評価するための衛生基準値を設定しているが、当該基準値の設定に至る考え方や根拠データについては、関係機関や文献等において公表されておらず、その詳細は不明であった。そのため、研究班で検討している衛生指標菌(一般細菌数と腸内細菌科菌群数)と同じ衛生指標菌を採用している牛と豚について、前述の国内と畜場の試行試験で得られた各施設の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の値を、EU 基準値と比較した(表8)。

次に、米国については、牛及び豚の衛生処理を評価するための衛生指標菌として大腸菌を採用している。その基準値の設定方法については、USDA-FSIS が実施している Nationwide Microbiological Baseline Data Collection Program により得られた全米の成績から合格判定値(m)を80パーセントイル、条件付き合格判定値(M)を98パーセントイルの各値を内部検証時の工程管理目標値として設定していることから、本研究では、一般細菌数ならびに腸内細菌科菌群数を指標細菌として、前述の国内と畜場の試行試験で得られた菌数データより、牛、豚、食鳥の国内基準値案1(以下、「米国参考基準」とする。)を算出した(表8,9)。この米国参考基準について、試行試験に参加した各施設(牛、豚、食鳥)の結果を個別に評価した。

また、その他の統計学的評価手法として、統計分析の一手法として、微生物試験の結果から平均値及び標準偏差を算出し、基準値を設定する方法(平均値+2 S.D.法)について、同じく前述の国内と畜場の試行試験で得られた菌数データより、食鳥の国内基準値案2(以下、「平均値+2 S.D.」とする。)を算出した(表9)。当該手法については、個別の施設において、微生物試験で得られた菌数データを基に、平均値+2 S.D.値を設定することも可能であることから、試行試験に参加した施設(牛、豚、食鳥)における平均値+2 S.D.を算出し、個別に衛生管理の実施状況を評価した。なお、食鳥については、2) 米国参考基準及び3) 平均値+2 S.D.について、「全施設」(n=12)の値、或いは採材~輸送工程にかけて、時間等の逸脱が想定された2施設及び外剥ぎ方式の成鶏処理施設(n=1)を除く施設について、「肉用若鳥・中抜き施設」(n=6)と「成鶏・中抜き施設」(n=3)の別に、それぞれ試算した(表9)。

その結果、牛では、1) EU 基準では、m 未満は27-

30 検体/施設、m 以上 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 (表 10)。

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 (表 10)。

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 (表 12)。

また、3) 「平均値+2 S.D.」を処理方式の別に求めた結果、「肉用若鳥・中抜き施設」では一般細菌数が 5.54 log cfu/g、腸内細菌科菌群数が 4.47 log cfu/g となったほか、「成鶏・中抜き施設」では一般細菌数が 6.07 log cfu/g、腸内細菌科菌群数が 3.79 log CFU/g と算出された。これらの数値を基に、各施設の不適合検体数を比較した結果、一般細菌数については 0~5 検体/施設が、腸内細菌科菌群数については 0~5 検体/施設の範囲で認められた (表 12)。

事後アンケートの概要を表 13、ならびに資料 3~5 に示す。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。

一方、食鳥処理場での検証を行う上では、検査所から対象施設までの物理的距離がある場合が多く、人員確保が困難であること、防疫上からも同日に検査員が複数施設を出向くことが困難であること等が意見として挙げられた。

②評価法の改善に関する検討 (1) : 採材面積の縮小の可能性に関する検討

資料 6 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 あたりの菌数および統計解析結果を示した。

牛枝肉 100 cm² 及び 25 cm² の臀部、ともばら、頸部の 3 か所の一般細菌数は、各々、4,224 cfu/cm² (3.38 log cfu/cm²)、3,779 cfu/cm² (3.28 log cfu/cm²) であった。牛枝肉 100 cm²、25 cm² とともに菌数の Anderson-Darling 検定では非正規分布であり、Mann-Whitney U 検定を実施したところ、 $p=0.289$ であり、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。また、臀部 - ともばら、臀部 - 胸部、ともばら - 胸部の一般細菌数の有意差は無かった。なお、一般細菌数の対数値で検定しても有意差は無かった。

豚枝肉 100 cm² 及び 25 cm² の臀部、胸部、頸部の 3 か所の一般細菌数は、各々、426.34 cfu/cm² (2.63 log cfu/cm²)、554.78 cfu/cm² (2.74 log cfu/cm²) であった。豚枝肉 100 cm² は Anderson-Darling 検定では正規分布、25 cm² は非正規分布であった。Mann-Whitney U 検定を実施したところ、 $p=0.975$ であり、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。また、臀部 - 胸部、臀部 - 頸部、胸部 - 頸部の一般細菌数の有意差は無かった。なお、一般細菌数の対数値で検定しても有意差は無かった。

③評価法の改善に関する検討 (2) : 新規採材部位としての牛頸部の検討

わが国の牛施設 A~D 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、ならびに腸内細菌科菌群数を比較した(図4)。

施設Aでは、「ともばら」(5検体)が61.9~401.4 cfu/cm²、に対し、「頸部」(25検体)は、35.3~1172.5 cfu/cm²、施設Bでは「ともばら」(30検体)がud~3613.4 cfu/cm²、に対し、「頸部」(30検体)は、ud~729.6 cfu/cm²、施設Cでは「ともばら」(1検体)が3300.0 cfu/cm²、に対し、「頸部」(22検体)は、18.9~13622.4 cfu/cm²、施設Dでは「ともばら」(4検体)がud~208.0 cfu/cm²に対し、「頸部」(12検体)は、ud~267.7 cfu/cm²であった。いずれも、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。なお、腸内細菌科菌群については、全ての検体のうち、3検体のみから検出されたため、比較しなかった。

④評価法の改善に関する検討(3):新規採材部位としての牛胸部の検討

牛胸部切除片(25 cm²)中の一般細菌数を n=30 の条件で測定した。平均値は 3.24 log cfu/cm² となった。n=30 の一般細菌数は正規分布を示した。切除片の腸内細菌科菌群数は平均 0.30 log cfu/cm² で、30 検体中 16 検体が非検出であった。

⑤HACCP システムの継続的評価法としてのムービング・ウインドウ

ムービング・ウインドウアプローチはコーデックスの「食品に関連する微生物規格の原則と適用のガイドライン」(CAC/GL 21 - 1997)、2013 年に最終改訂)で導入された概念である。

ムービング・ウインドウアプローチでは十分な数のサンプルユニット (n) が決められた期間、“ウインドウ window” 内に収集される。結果は最後のサンプルユニットの結果が微生物基準値 (m, M)、及び m を超えても許容されるサンプル数 c を用いて評価される。サンプル期間内に新しい結果が得られた場合、その結果は”ウインドウ “に加えられ、同時に最古の結果は”ウインドウ “から除かれることにより、”ムービング・ウインドウ “が創られる。このアプローチは結果のセット(例えば1週間に得られた結果)にも適用することができる。”ウインドウ “は必ず n の結果から構成され、1つまたはセットの結果が得られる都度、時間軸としては前へ移動し

ていく。”ウインドウ “のサイズを決めるときには、食品安全コントロールシステムまたは工程のパフォーマンスを適切に検証するのに十分な数の結果が得られるように、生産の頻度とサンプリング頻度を検討すべきである。

ムービング・ウインドウアプローチは工程または食品安全コントロールシステムの微生物的パフォーマンスを継続的に検証するうえで実務的で、コスト上有益な方法である。古典的な微生物規格に対する検査(例えば一度に5検体を採取し、その製品の許容性を検査で確認する微生物規格)と異なり、ムービング・ウインドウアプローチは衛生管理のパフォーマンスの許容性を判断するもので、もし、コントロールが不十分になれば、適切な介入を行い、工程管理を元に戻すことができる。

行政機関がこのムービング・ウインドウアプローチを世界で初めて導入したのは、米国 FSIS の Pathogen Reduction and HACCP rule である。ムービング・ウインドウは施設の HACCP 及び一般衛生管理のパフォーマンスの継続的なピクチャーを提供し、一度に1ロットからサンプルを採取して検査するよりも、継続的なプロセスを評価する上で望ましい統計的なアプローチであるとしている。従って、と畜場の事業者が実施する13の連続サンプル(これが1 window)において、条件付き合格値を3回以上超えることは、規則の要件を満たしていないことを示唆することになるとしている。食肉衛生行政の世界では、米国の Pathogen Reduction/HACCP” 規則のなかで、moving window のアプローチが最初に導入された。事業者が行う generic *E.coli* を指標菌として検査は n=13 で、最新のデータが得られると、それが window に加えられ、最古のデータが window” から削除される。これらの “moving window” の結果はその期間の工程管理の評価として考えられた。例えば、牛の場合、

$$\begin{aligned} m &= \text{不検出} \\ M &= 100 \text{ cfu/cm}^2 \\ n &= 13 \\ c &= 3 \end{aligned}$$

この場合、13 サンプル中、一度でも 100 cfu/cm² を超えた時、または不検出と 100 cfu/cm² の間のサンプル数が 4 以上となった場合は一般衛生管理と HACCP プランの見直しが必要となる。逆に 13 サンプルすべてが不検出、または不検出と 100 cfu/cm² の間のサンプル数

が1か2の場合は衛生管理のパフォーマンスは問題ないということになる。表14にさらに説明する(9 CFR Part 304, et al. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule)。

ニュージーランドでも鶏肉のカンピロバクターコントロールの検証として MW アプローチを用いて評価している。このアプローチは継続的な行政上の検証を経時的に行うことを可能にしているとしている。それは *poor performance* の傾向を重要視し、加工業者を一度限りの高い菌数により罰するわけではない。加工業者は行政機関による対応の前に、衛生管理手順を修正する機会が与えられる。表15にその適用の事例を示した (Lee *et al.* Food Control, 58 (12): 23-38, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.012)。

D. 考察

①と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの評価法(案)の検証試験

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、Anderson-Darling 検定により正規性の確認をしたところ、正規分布に従わなかった。すなわち、各施設で得られる枝肉の衛生状況は、個体差が大きく、データは不規則に分布する傾向があるため、施設の衛生状況を評価する際には、ノンパラメトリック検定を使用する必要があると考えられた。さらには、基準値の設定においても、平均値ではなく、パーセンタイルなど、順位に基づく値を用いるべきと考えられた。

本研究では、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の設定方法として、1) EU の事例、2) 米国の事例、3) その他の統計学的評価手法を検討し、本研究の成績に基づく国内基準値案を暫定的に算出した。

その結果、EU の事例については、EC 規則で規定されている衛生基準値の設定根拠の詳細は不明であり、EU の事例を参考にした国内基準値案の設定は不可能であった。そのため、当該 EU 基準値をその他の国内基準値案と比較検討した。

米国参考基準については、その *m* ならびに *M* の各値は、牛、豚ともに、1) EU 基準に比べ、低値となった。

また、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 2.9~4.5 log cfu/cm² となり、EU 基準の *m*、*M* (それぞれ 3.5 log cfu/cm²、5.0 log cfu/cm²) の間にほとんどが含まれる結果となった。豚では、2.9~4.1 log cfu/cm² となり、EU 基準の *m* (4.0 log cfu/cm²) より低値となるものがほとんどであったことから、3) 「平均値+2 S.D.」に基づく基準値は、1) EU 基準値と比べ、より低値となった。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施設間での多様性が高い状況であった。一部の施設では、採材後の検体輸送時間がプロトコル試行案で設定した 48 時間にほぼ近いものもあったため、これらは暫定基準値設定の根拠からは省いて検討を進めた。また、処理方式の違い等も影響要因と想定され、6 施設の「肉用若鳥・中抜き方式」の施設で得られた指標菌暫定基準値は、「成鶏・中抜き方式」施設で得られた同数値に比べ、相対的に低値を示した。なお、牛・豚とは異なり、食鳥処理施設での指標菌成績を基に算出された 3) 「平均値+2 S.D.」による暫定基準値は、2) 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。今回、食鳥処理施設のうち、外剥ぎ方式の成鶏食鳥処理施設については 1 施設のみが検討可能であったことから、今後、同方式の施設データについては、特に集積する必要があると思われる。

各施設で処理された牛と豚の枝肉のうち、1) EU 基準、2) 米国参考基準、3) 「平均値+2 S.D.」の各基準候補値を越えた検体数は、それぞれの基準によって大きく異なった。例えば、牛 E 施設で処理されたもののうち、*m* 以上となったものは 1) EU 基準で 3 検体、2) 米国参考基準で 10 検体であったが、3) 「平均値+2 S.D.」基準では 2 検体で、基準値は 4.5 log cfu/cm² と高値であった。これに対し、牛 D 施設で処理されたもののうち、*m* 以上となったものは 1) EU 基準で 1 検体、2) 米国参考基準で 6 検体であったが、3) 「平均値+2 S.D.」基準では 5 検体で、基準値は 3.4 log cfu/cm² と低値であった。

以上のことから、3) 「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。

今回、米国の事例を参考に国内基準値案を算出したが、これらは、全国の施設のデータを基に算出した値ではなく、施設の規模等を考慮した数値でないことや牛についてはともばら、豚については胸部の切除検体から得られた数値を基に算出したものであることから、今後は統一的な採取手順や試験方法に基づく全国的な成績を収集し、その結果に基づく基準値を設定する必要があると考えられた。その際には、枝肉から検出される一般細菌数は、正規分布しないことから、全国の値から順位に基づく基準値を設定する必要があると考えられた。また、米国では合格値 (m) を超え、条件付き合格値 (M) 以内の検体数の許容数 (c) を定めているため、国内基準値の設定においても将来の全国的な成績を基に c 値についても設定していく必要がある。以上の制約はあるものの、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。

一方、腸内細菌科菌群数に基づく基準値については、検出される検体数が少なく、基準値の設定には、改めて検体数を増やして検討する必要がある。なお、本研究において、腸内細菌科菌群数に基づく基準値を越えた検体は、必ずしも一般細菌数に基づく基準値 (m や「平均値+2 S.D.」) を超えていないものも含まれていたことから、衛生指標菌としては、両者を併用する必要があると考えられた。

「と畜場・大規模食鳥処理施設 HACCP システムの評価法」の試行試験の実施における問題点を抽出することを目的として行ったアンケート調査を通じ、使用器具の不具合として、特に無鉤ピンセットが適切とは言いがたいこと、ディスプレイのメスは切除に支障があったことが意見として挙げられた。今後、HACCP 検証を進める上で使用器具の選定は必要不可欠な事項であり、その意味においてこれらの意見は参考とすべき内容と考えられる。更には、と畜場の一部施設では、事業者への理解が得られない、もしくは、得にくいことも明らかとなった。主な理由としては、従来の拭き取り法では、採材した後の枝肉に、全く影響が無いのに比べ、切除法による採材は、枝肉に損傷を残すことから、市場価値に影響することが危惧されている。今後、プロトコルの運用に

先駆け、当該手法の有効性、必要性について、対象施設に対して十分な説明と啓蒙が必要である。今後、本研究で抽出された問題点を反映させたプロトコルの改善が必要であろう。

②評価法の改善に関する検討 (1) : 採材面積の縮小の可能性に関する検討

本研究で、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 あたりの菌数および統計解析を実施した。

牛枝肉(臀部、ともばら、頸部の 3 か所)の 100 cm² 及び 25 cm² の一般細菌数は同様であった。また、豚枝肉(臀部、胸部、頸部の 3 か所) の 100 cm² 及び 25 cm² の一般細菌数は同様であった。よって、100 cm² の切除法でも、25 cm² の切除法でも、同様であった。よって、わが国で切除法で実施する場合は、25 cm² で実施する方が良いと思われた。また、牛の臀部、ともばら、頸部の 3 か所の一般細菌数では差が無かった。豚の臀部、胸部、頸部の 3 か所の一般細菌数では差が無かった。よって、切除作業しやすい部位を採取しても、HACCP が導入した後の、検証作業で支障はないと思われた。

③評価法の改善に関する検討 (2) : 新規採材部位としての牛頸部の検討

本研究で実施した A~D のいずれの施設において検討した成績においても、「ともばら」と「頸部」でそれぞれ採材された検体の値に、有意差は認められなかったことから、牛においては、「ともばら」に加え、「頸部」についても、代替できるものと考えられた。しかしながら、本研究では、各施設毎に多くて 30 検体のみの成績である。今後、より多くの検体を用いて、検討する必要がある。

④評価法の改善に関する検討 (3) : 新規採材部位としての牛胸部の検討

胸部切除法における n=30 での一般細菌数の平均値 3.24 log cfu/cm² は、②の他部位切除法における 3.28 log cfu/cm² と比較しても差はなく、得られた結果は正規分布を示した。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。今後成績の蓄積が必要ではあるが、各検査機関は、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。

⑤ HACCP システムの継続的評価法としてのムービング・ウインドウの有用性

と畜場および大規模食鳥処理施設に導入された HACCP システムは、そのシステムが稼働する限り、システムが意図したとおり機能しているか検証する必要がある。HACCP の 7 原則中、原則 6 では、CCP モニタリングのほか、一般衛生管理と HACCP プランが意図したとおりのハザードの管理ができていないか確認することが求められており、その 1 つの手法が継続的に実施される微生物検査である。この観点からは、例えば 1 年間に 1 回の検証というような一定期間に一度実施する検証より、連続的にかなりの高頻度で衛生管理の出来栄を検証することがより望まれる。

と畜場および大規模食鳥処理施設に導入される HACCP システムは、導入後は永続的に運用されることとなる。同システムを評価する場合、「微生物規格」と「基準値」の設定、および基準値を逸脱した場合の対処策を講じたのちは、「継続的」評価法としてムービング・ウインドウの導入をすることが望まれる。

E. 結論

①と畜場・大規模食鳥処理施設 HACCP システムの評価法の検証試験

- 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と考えられた。
- 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。
- 食鳥を対象とした外部検証プロトコール案試行により、施設間での差異が極めて大きく、また処理方式の別によって指標菌数分布が異なる状況にあることが示された。
- 同一施設内での成績変動を検証するという観点で、各施設において 3) 「平均値+2 S.D.」を算出して、その基準値に対して、定期的の実施する微生物試験結果の評価を通じて

HACCP システムの実施状況を評価することは可能と考えられた。

- 欧米のと畜場・食鳥処理施設における微生物的 HACCP 検証方法の実施状況や国内全体の施設の底上げを図る観点からは、今後は、国内のと畜場・食鳥処理施設における衛生指標菌に関する状況を全国的に把握した上で、全国的に統一された国内基準値の設定の在り方を検討する必要がある。
- 今後①1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、基準値を設定することにより、わが国の実情に合った基準値を改めて設定する、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。

②評価法の改善に関する検討(1): 採材面積の縮小の可能性に関する検討

- 牛枝肉及び豚枝肉では 25 cm²の切除法でも評価できる。
- 牛枝肉・豚枝肉ともに、切除作業しやすい部位を採取しても、HACCP を導入した後の、検証作業で支障はない

③評価法の改善に関する検討(2): 新規採材部位としての牛頸部の検討

- 牛においては、「ともばら」に加え、「頸部」についても、代替できるものと考えられた。

④評価法の改善に関する検討(3): 新規採材部位としての牛胸部の検討

- 牛においては、「ともばら」、「頸部」に加え、「胸部」についても、採材部位として選択しても支障ないものと考えられた。

⑤継続的評価法としてのムービング・ウインドウ導入

- HACCP システムが導入された後は、継続的なシステムの評価が必要になる。ムービング・ウインドウの適用が望ましい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表等

1. 壁谷英則、と畜場・食鳥処理場における HACCP システム検証プロトコル、令和元年度千葉県食肉衛生技術研修会、(千葉聴覚障害者センター) 2019年11月13日
2. 森田幸雄、厚生労働科学研究におけると畜場 HACCP 検証手法の検討状況について、令和元年度食肉・食鳥肉技術研修会 (東京証券会館) 2020年1月21日
3. 朝倉宏、厚生労働科学研究における食鳥処理場

HACCP 検証手法の検討状況について、令和元年度食肉・食鳥肉技術研修会 (東京証券会館) 2020年1月22日

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

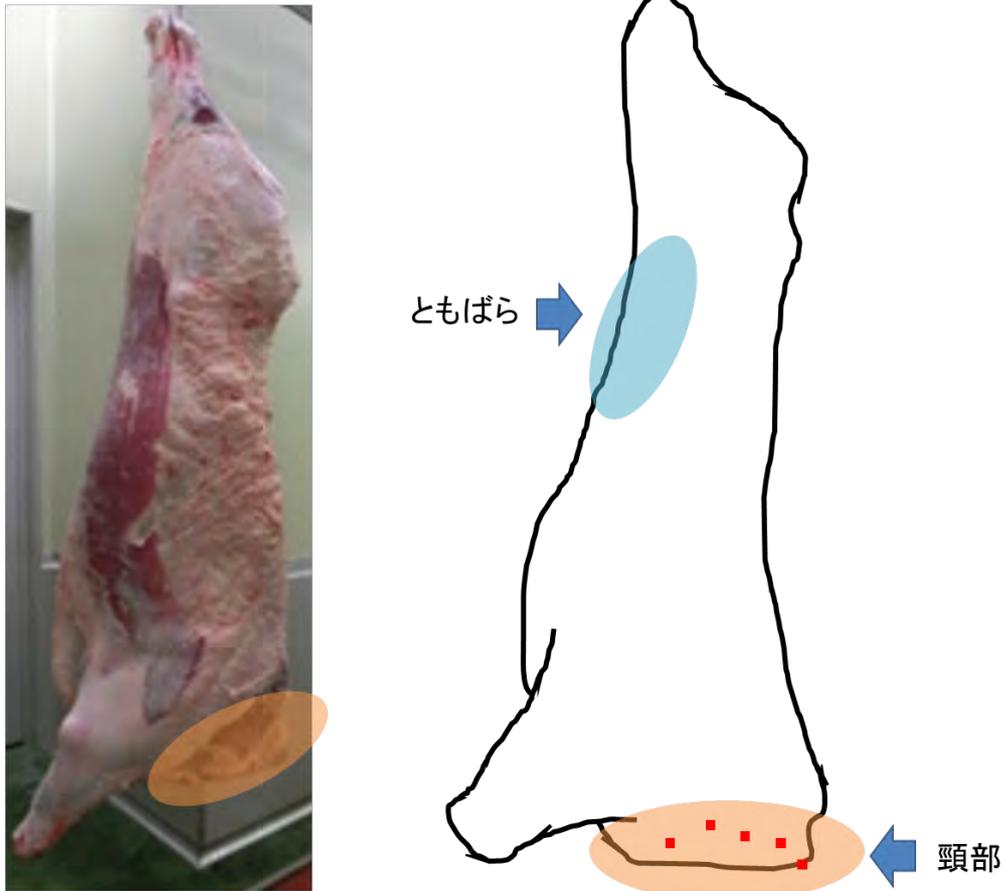


図1 牛施設A～Dで処理された枝肉の頸部、ともばらの切除部位

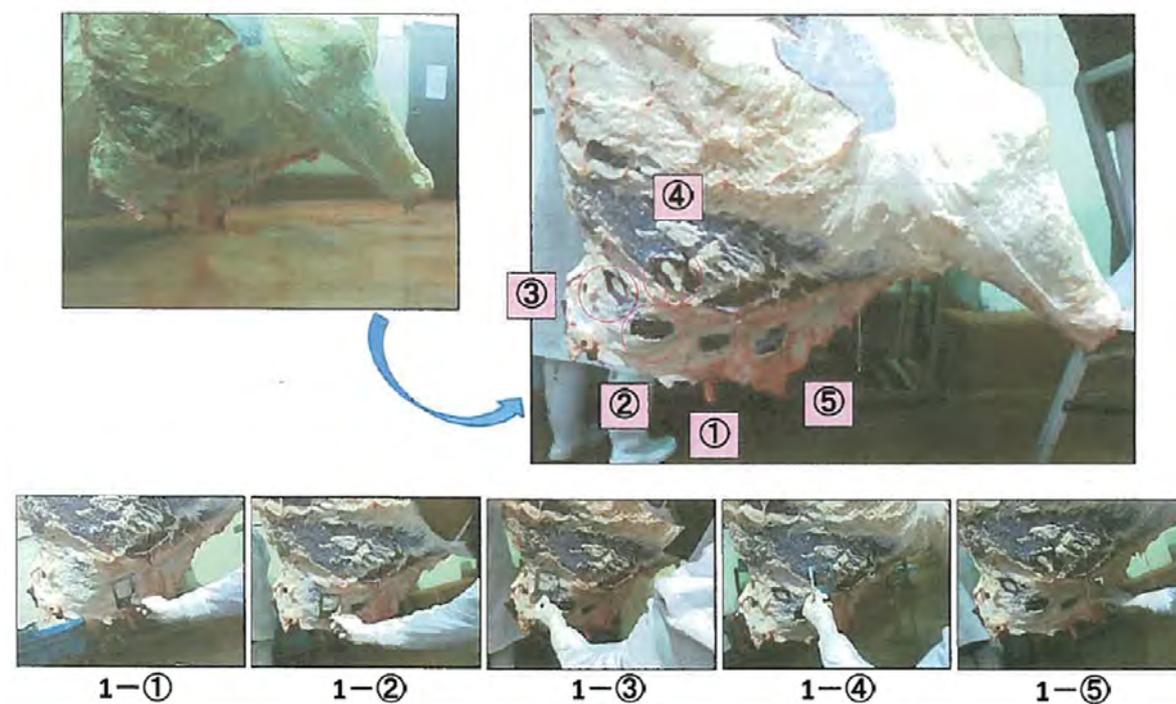


図2 牛枝肉の切除部位候補：胸部の詳細



図3 牛枝肉の切除部位候補：胸部

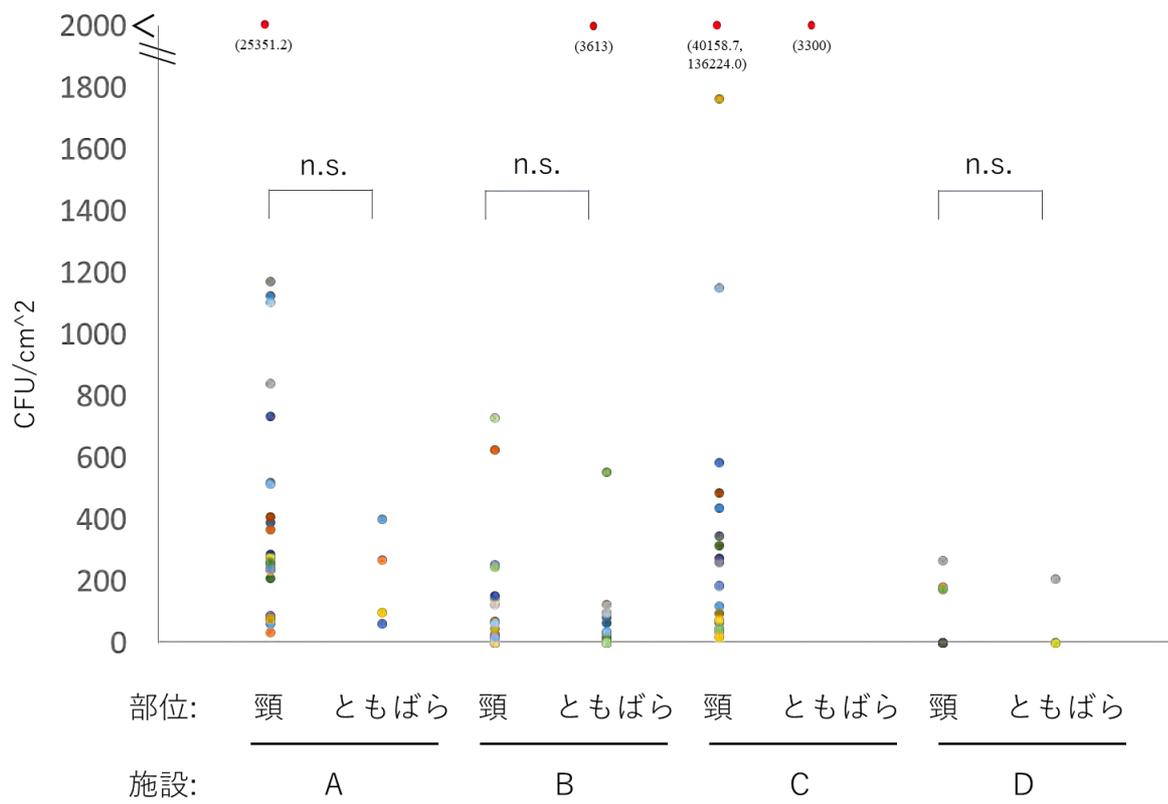


図4 牛施設A~Dで処理された枝肉の頸部、ともばらにおける一般細菌数

表1 本研究で対象としたと畜場の年間処理頭数、稼働日数、HACCP導入状況

対象家畜	施設	年間処理頭数	稼働日数	HACCP導入
牛	牛A			
	牛B	16490	235	2009/12
	牛C	1148	86	2020予定
	牛D	1398	242	2018/3
	牛E	45842	246	2017/4
	牛F	3679	110	2011/3
	牛G	14217	255	2009/3
	牛H	16695	232	2011/3
豚	豚A	121782	250	2011/2
	豚B	247435	251	2016/10
	豚C	114509	245	2016/12
	豚D	78118	244	2020予定
	豚E	100230	242	2018/3
	豚F	4219	246	2017/4
	豚G	98722	245	-
	豚H	92903	239	2011/3
	豚I	137239	251	2006/12
	豚J	229496	252	2014
	豚K	260860	254	2017/9
	豚L	216990	250	2017/11

表2 と畜場で処理された牛枝肉を対象とした HACCP システムの評価試験

: 一般細菌数

施設	検体数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	50 th -セリタイル	80 th -セリタイル	98 th -セリタイル
牛A	30	ud	1603.1	119.8	332.4	ud	22.7	1112.1
牛B	30	101.8	73872	3537.8	13347.6	633.4	1966.5	34351.7
牛C	30	ud	3375.5	256.3	689.0	ud	161.2	2434
牛D	30	ud	3194.6	673.7	941.3	247.1	993.9	3053.3
牛E	30	ud	34200	3351.3	8266.9	730.6	1865.9	31274.5
牛F	29	ud	6309.1	698.5	1234.2	280.2	971.2	4036.2
牛G	30	ud	3430.6	450.5	807.2	47.5	572.1	2814.9
牛H	30	ud	11223.8	950.7	2278.8	193.4	817.5	8328.8
全体	239	ud	73872	1263.5	5713.2	208.8	990.8	7488.6

単位： cfu/cm²， ud:検出下限値未満

表3 と畜場で処理された牛枝肉を対象とした HACCP システム評価試験

：腸内細菌科菌群数

施設	検体数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	50 th -センタイル	80 th -センタイル	98 th -センタイル
牛A	30	ud	ud	0	ud	ud	ud	ud
牛B	30	1319.7	46.53	240.9	ud	ud	598.4	ud
牛C	30	ud	ud	0	ud	ud	ud	ud
牛D	30	168.3	5.6	30.7	ud	ud	70.7	ud
牛E	30	71.4	2.4	13	ud	ud	30.0	ud
牛F	29	241.4	12	48.5	ud	ud	173.1	ud
牛G	30	ud	ud	0	ud	ud	ud	ud
牛H	30	192.7	8.9	37.2	ud	ud	126.2	ud
全体	239	1319.7	9.5	88.6	ud	ud	86.5	ud

単位：cfu/cm²，ud：検出下限値未満

表4 と畜場で処理された豚枝肉を対象とした HACCP システム評価試験分析
：一般細菌数

施設	検体数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	50パーセンタイル	80パーセンタイル	98パーセンタイル
豚A	30	ud	1680.0	156.7	312.4	93.7	216.0	941.1
豚B	40	62.8	5949.4	1054.8	1396.1	518.9	1577.3	5888.8
豚C	30	81.9	16600.0	2273.3	3708.8	934.1	2708.0	12928.6
豚D	30	ud	4654.2	314.7	877.5	49.5	180.4	2707.1
豚E	30	ud	33676.2	1320.6	6124.3	ud	393.3	15332.8
豚F	30	126.5	5906.7	1276.3	1373.4	791.1	2201.1	5022.2
豚G	30	ud	6200.1	1125.9	1302.4	725.9	1602.1	4861.0
豚H	29	ud	7109.7	715.2	1310.8	353.5	930.6	4092.2
豚I	30	ud	23341.2	2823.2	4987.3	1084.3	2956.8	18492.9
豚J	30	ud	4468.6	624.4	886.4	348.9	886.1	3045.1
豚K	30	ud	1161.6	208.6	327.5	ud	420.8	1115.4
豚L	30	ud	3616.0	1345.5	1115.4	1089.2	2295.1	3610.3
計	369	ud	33676.2	1103.0	2723.9	403.2	1283.5	7997.6

単位：cfu/cm²，ud：検出下限値未満

表5 と畜場で処理された豚枝肉を対象とした HACCP システム評価試験分析

: 腸内細菌科菌群数

施設	検体数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	50パーセンタイル	80パーセンタイル	98パーセンタイル
豚A	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚B	40	ud	86.6	2.2	13.7	ud	ud	19.1
豚C	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚D	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚E	30	ud	107.1	3.6	19.6	ud	ud	45.0
豚F	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚G	30	ud	259.6	8.7	47.4	ud	ud	109
豚H	29	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚I	30	ud	295.1	14.6	59.1	ud	ud	207.4
豚J	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚K	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
豚L	30	ud	ud	ud	0	ud	ud	ud
計	369	ud	295.1	2.4	22.8	ud	ud	ud

単位：cfu/cm²，ud：検出下限値未満

表 6 大規模食鳥処理場で本冷却後に採材した食鳥とたい由来検体を対象とした HACCP システムの評価試験試行結果：一般細菌数

施設	処理方式	検体数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	50 ^パ -センタイル	80 ^パ -センタイル	98 ^パ -センタイル
食鳥A	肉用若鳥・中抜き	30	6.08	7.40	6.90	0.31	6.90	7.18	7.37
食鳥B	成鶏・中抜き	30	5.28	6.30	5.85	0.23	5.83	6.05	6.24
食鳥C	肉用若鳥・中抜き	30	4.16	6.26	4.72	0.47	4.58	5.03	5.96
食鳥D	肉用若鳥・中抜き	30	ud	3.92	2.82	0.69	2.89	3.26	3.81
食鳥E	成鶏・中抜き	30	3.03	5.38	3.53	0.58	3.27	4.03	5.00
食鳥F	肉用若鳥・中抜き	30	4.14	5.67	4.71	0.39	4.79	5.04	5.43
食鳥G	肉用若鳥・中抜き	30	4.14	5.30	4.66	0.28	4.72	4.83	5.23
食鳥H	成鶏・外剥ぎ	30	4.94	6.16	5.41	0.34	5.35	5.79	6.11
食鳥I	肉用若鳥・中抜き	30	3.15	3.98	3.65	0.28	3.74	3.90	3.96
食鳥J	肉用若鳥・中抜き	30	2.84	5.10	3.37	0.44	3.34	3.57	4.43
食鳥K	肉用若鳥・中抜き	30	3.60	4.86	4.19	0.32	4.12	4.54	4.80
食鳥L	成鶏・中抜き	30	3.83	5.21	4.74	0.34	4.74	4.87	5.15
計		360	ud	7.27	5.97	1.16	4.51	5.45	7.12

単位：cfu/cm²，ud：検出下限値未満

表 7 大規模食鳥処理場での HACCP システム評価試験試行結果

: 腸内細菌科菌群数

施設	処理方式	検体数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	50 th -セタイル	80 th -セタイル	98 th -セタイル
食鳥A	肉用若鳥・中抜き	30	3.79	5.51	4.87	0.50	4.92	5.34	5.45
食鳥B	成鶏・中抜き	30	1.88	3.91	2.85	0.56	2.77	3.32	3.78
食鳥C	肉用若鳥・中抜き	30	3.07	4.49	3.66	0.42	3.60	4.08	4.41
食鳥D	肉用若鳥・中抜き	30	ud	2.98	1.50	0.61	1.30	1.91	2.85
食鳥E	成鶏・中抜き	30	1.00	3.29	1.51	0.80	1.00	2.45	3.10
食鳥F	肉用若鳥・中抜き	30	1.80	5.01	3.91	0.64	3.95	4.42	4.98
食鳥G	肉用若鳥・中抜き	30	1.95	3.63	2.54	0.30	2.50	2.69	2.92
食鳥H	成鶏・外剥ぎ	30	2.22	4.75	3.08	0.57	3.07	3.45	4.31
食鳥I	肉用若鳥・中抜き	30	1.81	2.89	2.30	0.31	2.34	2.56	2.86
食鳥J	肉用若鳥・中抜き	30	0.70	2.94	1.81	0.60	1.78	2.19	3.09
食鳥K	肉用若鳥・中抜き	30	1.88	3.72	2.67	0.42	2.60	3.07	3.60
食鳥L	成鶏・中抜き	30	1.48	4.31	3.15	0.65	2.53	2.94	4.04
計		360	ud	5.51	4.11	1.10	2.62	3.72	5.32

単位：cfu/cm²，ud：検出下限値未満

表 8 と畜場 HACCP システム評価試験を通じた暫定基準値の例

参考	対象	指標細菌	合格判定値(m) (log cfu/cm ²)	条件付き合格判定値 (M) (log cfu/cm ²)
EU基準	牛	一般細菌数	3.5	5.0
		腸内細菌科菌群数	1.5	2.5
	豚	一般細菌数	4.0	5.0
		腸内細菌科菌群数	2.0	3.0
米国参考基準	牛	一般細菌数	3.0	3.9
		腸内細菌科菌群数	0	1.9
	豚	一般細菌数	3.1	3.9
		腸内細菌科菌群数	0	0

表9 大規模食鳥処理場 HACCP システム評価試験を通じた暫定基準値例

参照	対象	試験項目	合格判定値(m) (log cfu/g)	条件付き合格判定値 (M) (log cfu/g)
米国参考基準*	食鳥全体 (12施設)	一般細菌数	5.45	7.12
		腸内細菌科菌群数	3.72	5.32
	肉用若鳥・中抜き (6施設)	一般細菌数	4.78	5.37
		腸内細菌科菌群数	3.69	4.60
	成鶏・中抜き (3施設)	一般細菌数	5.79	6.19
		腸内細菌科菌群数	3.00	3.88
平均値+2 S.D.	食鳥全体 (12施設)	一般細菌数	6.87	—
		腸内細菌科菌群数	5.00	—
	肉用若鳥・中抜き (6施設)	一般細菌数	5.54	—
		腸内細菌科菌群数	4.47	—
	成鶏・中抜き (3施設)	一般細菌数	6.07	—
		腸内細菌科菌群数	3.79	—

*m=80 パーセンタイル値、M=95 パーセンタイル値として算出

表 10 と畜場 HACCP システム評価試験の暫定基準値に基づく判定結果例

：一般細菌数

家畜	施設	EU基準			米国参考基準			「平均値+2 S.D.」		
		m未満	m以上 M未満	M以上	m未満	m以上 M未満	M以上	平均値+2 S.D. の値(cfu/cm ²)	平均値+2 S.D. の値(log cfu/cm ²)	平均値+2 S.D.以上の検 体数
牛	牛A	30	0	0	29	1	0	784.5	2.9	1
	牛B	27	3	0	18	12	0	30232.9	4.5	4
	牛C	29	1	0	28	2	0	1634.3	3.2	2
	牛D	29	1	0	24	6	0	2556.3	3.4	5
	牛E	27	3	0	20	7	3	19885.0	4.3	2
	牛F	28	1	0	23	6	0	3166.9	3.5	1
	牛G	29	1	0	26	4	0	2064.9	3.3	2
	牛H	28	2	0	24	5	1	5508.2	3.7	2
豚	豚A	30	0	0	29	1	0	781.5	2.9	1
	豚B	30	0	0	20	10	0	3847.1	3.6	3
	豚C	28	2	0	19	8	3	9690.8	4.0	3
	豚D	30	0	0	28	2	0	2069.6	3.3	1
	豚E	29	1	0	28	1	1	13569.2	4.1	1
	豚F	30	0	0	22	8	0	4023.1	3.6	2
	豚G	30	0	0	22	8	0	3730.6	3.6	2
	豚H	29	0	0	25	4	0	3336.7	3.5	1
	豚I	28	2	0	17	10	3	12797.7	4.1	2
	豚J	30	0	0	26	4	0	3283.5	3.5	1
	豚K	30	0	0	30	0	0	863.5	2.9	2
	豚L	30	0	0	19	11	0	3576.3	3.6	2

表 11 と畜場 HACCP システム評価試験の暫定基準値に基づく判定結果例

：腸内細菌科菌群数

家畜	施設	EU基準			米国参考基準			「平均値+2 S.D.」		
		m未満	m以上 M未満	M以上	m未満	m以上 M未満	M以上	平均値+2 S.D. の値(cfu/cm ²)	平均値+2 S.D. の値(log cfu/cm ²)	平均値+2 S.D.以上の検 体数
牛	牛A	30	0	0	30	0	0	0	NA	NA
	牛B	28	1	1	28	1	1	528.3	2.7	1
	牛C	30	0	0	30	0	0	0	NA	NA
	牛D	29	1	0	29	1	0	67.1	1.8	1
	牛E	29	1	0	29	1	0	28.5	1.5	1
	牛F	27	2	0	27	0	2	109	2.0	2
	牛G	30	0	0	30	0	0	0	NA	NA
	牛H	28	2	0	28	1	1	83.4	1.9	1
豚	豚A	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA
	豚B	30	0	0	29	NA	1	29.6	1.5	1
	豚C	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA
	豚D	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA
	豚E	29	0	1	29	NA	1	42.6	1.6	1
	豚F	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA
	豚G	29	0	1	29	NA	1	103.4	2.0	1
	豚H	29	0	0	29	NA	0	0	NA	NA
	豚I	28	0	2	30	NA	0	132.9	2.1	2
	豚J	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA
	豚K	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA
	豚L	30	0	0	30	NA	0	0	NA	NA

* NA, Not available

表 12 大規模食鳥処理施設における HACCP システム評価試験を通じて算出された暫定基準値および同数値に基づく判定結果例

項目	対象施設	処理方式	2) 米国参考基準 (施設別)			2) 米国参照基準 (処理方式別) *1			3) 「平均値 + 2SD」			
			<m	m~M	>M	<m	m~M	>M	平均値 + 2SD (log CFU/g) (施設別)	逸脱数 (施設別)	逸脱数 (処理方式別)	
一般細菌数	食鳥A	肉用若鳥・中抜き	23	6	1	0	0	30	7.52	0	30	
	食鳥B	成鶏・中抜き	24	5	1	11	16	3	6.30	1	6	
	食鳥C	肉用若鳥・中抜き	24	5	1	22	5	3	5.65	2	2	
	食鳥D	肉用若鳥・中抜き	24	5	1	30	0	0	4.21	0	0	
	食鳥E	成鶏・中抜き	23	6	1	30	0	0	4.69	2	0	
	食鳥F	肉用若鳥・中抜き	23	6	1	16	13	1	5.49	1	1	
	食鳥G	肉用若鳥・中抜き	23	6	1	18	12	0	5.22	1	0	
	食鳥H	成鶏・外剥ぎ*2	23	6	1	24	6	0	6.08	1	2	
	食鳥I	肉用若鳥・中抜き	24	5	1	30	0	0	4.20	1	0	
	食鳥J	肉用若鳥・中抜き	23	6	1	29	1	0	4.25	1	0	
	食鳥K	肉用若鳥・中抜き	23	6	1	29	1	0	4.82	1	0	
	食鳥L	成鶏・中抜き	22	7	1	30	0	0	5.11	1	0	
	腸内細菌科菌群	食鳥A	肉用若鳥・中抜き	24	5	1	0	7	23	5.87	0	23
		食鳥B	成鶏・中抜き	23	5	2	21	7	2	3.97	0	2
食鳥C		肉用若鳥・中抜き	24	5	1	17	13	0	4.50	0	1	
食鳥D		肉用若鳥・中抜き	23	6	1	30	0	0	2.72	2	0	
食鳥E		成鶏・中抜き	23	6	1	29	1	0	3.12	1	0	
食鳥F		肉用若鳥・中抜き	25	4	1	8	18	4	5.18	1	5	
食鳥G		肉用若鳥・中抜き	22	6	2	30	0	0	3.14	0	0	
食鳥H		成鶏・外剥ぎ*2	24	5	1	14	13	3	4.22	1	4	
食鳥I		肉用若鳥・中抜き	24	5	1	30	0	0	2.92	1	0	
食鳥J		肉用若鳥・中抜き	23	6	1	30	0	0	3.01	1	0	
食鳥K		肉用若鳥・中抜き	24	5	1	30	0	0	3.51	1	0	
食鳥L		成鶏・中抜き	24	5	1	25	4	1	3.95	1	1	

*1 表 9 で求めた処理方式別の数値を用いて判定。

*2 2) 米国参照基準 (処理方式別) 欄では、成鶏・中抜き施設を対象として、表 9 で算出された数値を用いて判定。

表 13 と畜場 HACCP システムの評価実証試験の事後アンケート結果の概要

項目	牛施設		豚施設	
	問題あり	問題なし	問題あり	問題なし
回答施設数	7		11	
使用機具の不具合	5	2	11	0
施設業者への依頼	0	7	9	2
施設業者の反応	5	2	4	7
採材部位の設定	4	3	8	3
切除法の難易度	難：3, 普通：4, 易：0		難：6, 普通：4, 易：0(未回答1)	

表 14 ムービング・ウインドウアプローチの解析事例

検査番号	月日	検査結果 (cfu/cm ²)	結果は許容できないか?	結果は条件付き合格か?	直近 13 検査中、条件付き合格または許容できない検査数	Pass/Fail?
1	10月7日	10	No	YES	1	Pass
2	10月7日	不検出	No	NO	1	Pass
3	10月8日	50	No	YES	2	Pass
4	10月8日	不検出	No	NO	2	Pass
5	10月9日	不検出	No	NO	2	Pass
6	10月9日	不検出	No	NO	2	Pass
7	10月10日	80	No	YES	3	Pass
8	10月10日	不検出	No	NO	3	Pass
9	10月11日	不検出	No	NO	3	Pass
10	10月11日	不検出	No	YES	3	Fail
11	10月14日	50	No	NO	4	Fail
12	10月14日	不検出	No	NO	4	Fail
13	10月15日	不検出	No	NO	4	Fail
14	10月15日	不検出	No	NO	3	Pass
15	10月16日	不検出	No	NO	3	Pass
16	10月16日	不検出	No	NO	2	Pass
17	10月17日	120	Yes	NO	3	Fail

1. 検査番号 11(10月14日実施)の結果、条件付き合格のレンジに4サンプル目が入ったため、施設は許容できない工程管理の状態となり(直近13連続検査の結果で、条件付き合格数がリミットである3を超えてしまったため)この場合、施設は一般衛生管理及びCCP管理の見直し、修正を行う。
2. 検査番号12及び13は不検出であり、それゆえ、それぞれ単独では許容されるレンジである。しかし、直近13検査結果を考えた場合、依然として条件付き合格の数が3以上であるため、工程としては不合格となる。
3. 検査番号14で、直近の Moving Window の13中の条件付き合格の数が3に戻ったため、合格となった。
4. 検査番号17において、Mである100 cfu/cm²を超えたため、自動的に不合格となった。この場合、施設は検査員と共同して、一般衛生管理とCCP管理の問題点を究明し、修正することが必要となる。

表 15 ニュージーランドにおけるムービングウインドウ (MW) の例

Sampling Date	Moving Window (MW)	Campylobacter results (log ₁₀ CFU/carcass)			Number of Samples that exceed CPT		MW Acceptable ?	Total Score	Corrective Action Expected
					Each day	Each MW			
29-Mar-12	1	2.00	2.00	2.00	0				
30-Mar-12		3.34	3.70	3.30	0				
2-Apr-12		2.00	2.00	2.00	0				
3-Apr-12		3.15	2.78	2.00	0				
4-Apr-12		3.00	3.20	4.55	1				
5-Apr-12		2.00	4.15	4.68	2				
10-Apr-12		3.26	3.15	2.78	0				
11-Apr-12		3.20	2.00	2.00	0				
12-Apr-12		3.53	3.63	3.58	1				
13-Apr-12		2.60	3.64	2.80	0				
16-Apr-12		2	3.30	3.15	2.90	0			
17-Apr-12			2.00	2.00	2.00	0			
18-Apr-12			2.30	2.60	2.00	0			
19-Apr-12			2.00	2.30	2.00	0			
20-Apr-12			2.00	2.00	2.00	0	4	Yes	0
23-Apr-12	3	2.78	3.66	4.44	1				
24-Apr-12		2.30	2.30	2.00	0				
26-Apr-12		2.00	2.00	4.25	1				
27-Apr-12		3.00	2.00	2.00	0				
30-Apr-12		2.90	2.30	3.85	1	6	Yes	0	None
1-May-12	4	2.30	3.78	2.78	0				
2-May-12		3.26	4.09	3.56	2				
3-May-12		3.67	2.60	2.80	1				
4-May-12		2.00	2.30	3.41	0				
7-May-12		3.94	3.08	4.88	2	8	No	1	Review GHP & HACCP
8-May-12	5	3.70	3.48	4.88	1				
9-May-12		3.08	3.76	3.38	0				
10-May-12		2.00	3.08	2.60	0				
11-May-12		2.60	2.60	2.60	0				
14-May-12		3.00	3.00	4.14	1	10	No	2	Review Processing Equipment
15-May-12	6	6.03	3.68	3.98	3				
16-May-12		2.00	3.15	4.40	1				
17-May-12		2.00	2.00	2.00	0				
18-May-12		3.20	2.00	2.30	0				
21-May-12		2.00	2.00	2.99	0	11	No	3	Review Farm Biosecurity
22-May-12	7	2.00	2.00	2.00	0				
23-May-12		2.00	2.00	2.00	0				
24-May-12		2.00	2.00	2.00	0				
25-May-12		4.72	4.10	2.00	2				
28-May-12		3.15	4.21	3.88	2	10	No	4	Further Sampling & Testing
29-May-12	8	2.00	3.15	2.00	0				
30-May-12		2.00	2.00	2.00	0				
31-May-12		3.00	3.75	2.30	0				
1-Jun-12		2.00	2.00	2.00	0				
5-Jun-12		4.32	4.42	4.21	3	11	No	5	Extra Interventions
6-Jun-12	9	2.00	2.00	2.00	0				
7-Jun-12		2.00	2.00	2.00	0				
8-Jun-12		2.30	2.00	3.88	1				
11-Jun-12		2.00	2.00	2.00	0				
12-Jun-12		2.00	2.00	2.00	0	6	No	6	Regulatory Visit
13-Jun-12	2.00	2.00	2.00	0					
14-Jun-12	3.53	2.00	2.00	0					
15-Jun-12	2.00	2.00	2.00	0					
18-Jun-12	2.00	2.00	2.00	0					
19-Jun-12	3.79	3.48	2.00	1	5	Yes	0	None - Score is reset to 0	

1 window:1日3サンプル×5日×3週間=45サンプル。第1windowは3月29日から4月20日までの45サンプル。この間に食鳥中抜きと体のリンス液中のカンピロバクター数が3.78 log₁₀ cfu/とたいを超えるサンプルが6サンプルまでは合格。7を超えるると不適合としてGHP及びHACCPの見直し等の改善措置をとる。4月16日から5月7日までの第3windowにおいては3.78 log₁₀ cfu/とたいを超えるサンプルが8サンプルであったため、GHPとHACCPの見直しが行われた。