

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

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

平成 31 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

(北海道大学大学院獣医学研究院)

平成 30 年度 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」
班員名簿

| | | |
|-------|---|---------|
| 堀内 基広 | 北海道大学 大学院獣医学研究院 | 教授 |
| 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 |
| 飛梅 実 | 国立感染症研究所 感染病理部 | 主任研究官 |
| 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 学研究センター | センター長 |
| 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 | 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 |

目次

| | | |
|------|--|-----|
| I. | 総括研究報告書（平成 30 年度） | |
| | 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ | 2 |
| | 研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院） | |
| II. | 分担研究報告書 | |
| 1. | 非定型 BSE 感染牛の組織におけるプリオンの定量解析・・・・・・・・・・・・・・・・ | 1 3 |
| | 研究代表者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院） | |
| | 研究分担者 山崎 剛士（北海道大学・大学院獣医学研究院） | |
| 2. | 異常型プリオンタンパク質試験管内増幅法の改良・異種間変換における性状解析・・・ | 1 8 |
| | 研究分担者 新 竜一郎（宮崎大学・医学部） | |
| 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・・・・・・・・・・・・ | 2 3 |
| | 研究分担者 柴田 宏昭（自治医科大学・先端医療技術開発センター） | |
| | 研究分担者 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） | |
| 4. | 非定型 BSE 感染カニクイザル の病理学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 2 8 |
| | 研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部） | |
| 5. | カニクイザルへの L-BSE プリオンの経口投与実験（初代） および脳内接種実験（継代）の生化学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 3 1 |
| | 研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部） | |
| 6. | 非定型（H 型）BSE 感染牛の潜伏期間における PrP ^{Sc} 蓄積・・・・・・・・・・・・ | 3 5 |
| | 研究分担者 福田 茂夫（北海道総合研究機構・畜産試験場） | |
| 7. | BSE、L-BSE 感染動物の病態解析 ー異種間伝達実験による非定型 BSE の起源に関する研究ー・・・・・・・・・・・・ | 3 8 |
| | 研究分担者 古岡 秀文（帯広畜産大学・畜産学部） | |
| 8. | ウシ型プリオン蛋白質遺伝子発現トランスジェニックマウス を用いた非定型 BSE 感染牛のプリオン体内分布解析・・・・・・・・・・・・ | 4 2 |
| | 研究分担者 松浦 裕一（農研機構 動物衛生研究部門） | |
| 9. | わが国のと畜場ならびに大規模食鳥処理施設における HACCP システム評価法の実証試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 4 5 |
| | 分担研究者 森田 幸雄（東京家政大学・家政学部） | |
| | 分担研究者 壁谷 英則（日本大学・生物資源科学部） | |
| | 分担研究者 山崎 剛士（北海道大学・大学院獣医学研究院） | |
| | 分担研究者 鎌田 洋一（甲子園大学・栄養学部） | |
| III. | 研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 8 1 |
| IV. | 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 8 4 |

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（H 2 9-食品-一般-0 0 4）

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^C 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^C 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ルを試行した。その結果、1) 塩素中和剤の使用方法的説明、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レランス（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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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 (\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 ± 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 ± 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^C 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^C 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 ± 19 日で発症し、C-BSE および C-BSE をシード、ウシ PrP^C 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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）へのにおける PrP^{Sc} の蓄積をウェスタンブロット法により検索した。神経組織には PrP^{Sc} 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^{Sc} の分布を検索した結果、神経系組織のみににおいて PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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、接種材中にもし 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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）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/cm²）、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/cm²、切除法では ud~37,440.0 cfu/cm² 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/cm²、同切除法では ud~90,000.0 cfu/cm² 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/cm²、0.6 cfu/cm²、ud、ud であった。切除法では 1,810.3 cfu/cm²、37.5 cfu/cm²、4.1 cfu/cm²、22.9 cfu/cm² 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/cm²、1.0 cfu/cm²、ud、0.4 cfu/cm²、同切除法では 1,812.0 cfu/cm²、38.7cfu/cm²、4.1 cfu/cm²、18.7 cfu/cm²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 10⁻³ より、10 倍に希釈された 10⁻⁴ で ARF が高値を示した。つまり、10⁻³ 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^{Sc} 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^{2.2} LD₅₀/g および 10^{2.1} LD₅₀/g の感染価が存在すると考えられた。脳では 10^{7.4} LD₅₀/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しうること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^{Sc} 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^{Sc} 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) 塩素中和剤の使用方法的説明
- 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、切除法により採材の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^C 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^{Sc} 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的説明
 - ・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員による個人差

- ・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

II. 分 担 研 究 報 告 書

1. 非定型 BSE 感染牛の組織におけるプリオンの定量解析

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 感染牛の組織にお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。プリオン感染価測定ゴールドスタンダードは動物を用いたバイオアッセイであるが、2年以上の時間を要し、多くの検体を扱うことができない。そこで、2日程度の試験でプリオンの存在をアミロイド形成能で評価できる Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法により感染価の推定を実施した。感染価を測定済みの H-BSE および L-BSE 感染脳乳剤を標準試料として RT-QuIC を実施したところ、アミロイド形成速度 (Amyloid formation rate, ARF) を用いることで RT-QuIC の結果から感染価を推定する標準曲線が作成できた。そこで、中枢神経および末梢神経系組織、骨格筋、消化管等のプリオン感染価を推定した。その結果、中枢神経系組織では延髄の推定感染価と同等から 1/100 の感染価、抹消神経では背根神経節に延髄の 1/10 程度、座骨神経等の抹消神経に延髄の 1/1000 程度の感染価が存在することが示唆された。その他の組織では、L-BSE 感染牛の副腎および空腸で RT-QuIC が陽性となり、H-BSE 感染牛の空腸および咬筋で RT-QuIC 陽性となった。空腸では延髄の 1/100 (L-BSE) から 1/100,000 (H-BSE) 程度、L-BSE 感染牛の副腎では延髄の 1/1,000 程度、H-BSE 感染牛の咬筋では延髄の 1/100,000 (H-BSE) 程度の感染価が存在することが示唆された。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応用可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

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

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。

プリオン感染価測定ゴールドスタンダードは動物を用いたバイオアッセイであるが、2年以上の時間を要し、多くの検体を扱うことができない。そこで、2日程度の試験でプリオンの存在をアミロイド形成能で評価できる Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法により感染価の推定を実施した。

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ョッカーを用いて 20%乳剤 (PBS) を作製した。筋肉は Tissue grinder (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, 500 mM NaCl, 100 μ M EDTA, 10 μ M ThT を基本とし、必要に応じて、NaCl および rPrP の濃度、pH および SDS 濃度を変更した。また攪拌スピードは 432 - 218 rpm の範囲で変化させた。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) 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の逆数をミロイド形成速度 (Amyloid formation rate, ARF [1/h]) とした。ARF をアミロイド形成反応の指標とした。

(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) 感染価推定のための標準曲線の作成 (図 1)。

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 ARF (1/hr) をプロットした。感染価の対数 (\log_{10}) と ARF は直線関係が認められ、 10^{-3} から 10^{-4} , 10^{-4} から 10^{-7} , 10^{-7} 以降の 3 つに区分することができた。それぞれの近似式は H-BSE で ARF が 0.0167 (1/h) よりも大きい場合 (the 1st linear phase) は $\text{LD50/g} = e^{78.33x-2.71028}$, ARF が 0.0167 (1/h) より小さい場合 (the 2nd linear phase) は $\text{LD50/g} = e^{41.76x-2.1}$ であった。L-BSE では ARF が 0.0257 (1/h) より大きい場合は (the 1st linear phase) は $\text{LD50/g} = e^{71.37x-2.157}$, ARF が 0.0257 (1/h) より小さい場合 (the 2nd linear phase) は $\text{LD50/g} = e^{30.17x-1.1}$, であった。 10^{-4} に比べて 10^{-3} で ARF が低くなること、言い換えると、RT-QuIC 陽性となるまでの時間が長くなることは、RT-QuIC でのアミロイド形成反応が高濃度の組織乳剤により阻害されるためと考えられる。

2) H-BSE の各種組織における感染価の推定 (図 2、表 1)。

H-BSE 実験接種牛の中樞神経系組織には延髄と同等から 1/100 程度の感染価があると推定できた。また、末梢神経では、背根神経節で延髄と同程度から 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。

D. 考察

ARF を指標とすることで、RT-QuIC と感染価の対数に直線関係が認められたことから、RT-QuIC を用いて、プリオン感染価を定量的に推定することが可能となった (図 1)。本研究で作成した感染価-ARF 標準曲線は、今後も、非定型 BSE 感染牛の組織におけるプリオン感染価の推定に活用可能である。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^{-3} より、10 倍に希

釈された 10^{-4} で ARF が高値を示した。つまり、 10^{-3} 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^{Sc} 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¹⁾。

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。

E. 結論

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。

<引用論文>

1. Henderson DM, Tennant JM, Haley NJ, Denkers ND, Mathiason CK, Hoover EA. Detection of chronic wasting disease prion seeding activity in deer and elk feces by real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol*, 2017 Jul;98(7):1953-1962. doi: 10.1099/jgv.0.000844..

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Retrograde Transport by Clathrin-Coated Vesicles is Involved in Intracellular Transport of PrP^{Sc} in

Persistently Prion-Infected Cells. *Sci Rep*, 8 (1):12241, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30775-1

- 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), 2019, doi: 10.1292/jvms.19-0003

2. 学会発表

- 1) Nakayama M, Shan Z, Yamasaki T, Hasebe R, Sawada K, Horiuchi M. Alteration of microglial activation state by mesenchymal stem cells. Prion2018, Santiago de Compostela, Spain, May 22-25, 2018
- 2) Shimakura A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Identification and transcriptome analysis of brain regions vulnerable to neuronal loss in prion infection. Prion2018, Santiago de Compostela, Spain, May 22-25, 2018
- 3) Sawada K, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Iwamaru Y, Maatsuura Y, Miyazawa K, Atarashi R, Horiuchi M. The estimation of infectivity titers in tissues of cattle infected with atypical BSE by RT-QuIC. Asian Pacific Prion Symposium 2018, Tokyo, Japan, Oct 4-5, 2018
- 4) Tanaka M, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Direct effects of PrP^{Sc} on synaptopathy and transcriptional alterations in cultured neurons. Asian Pacific Prion Symposium 2018, Tokyo, Japan, Oct 4-5, 2018

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

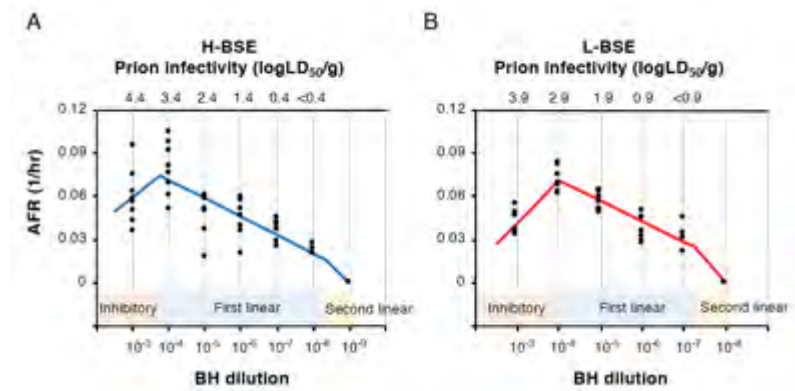


図1 H-BSE (A) および L-BSE (B) の感染価を推定するための、感染価-アミロイド形成速度 (ARF) 標準曲線。

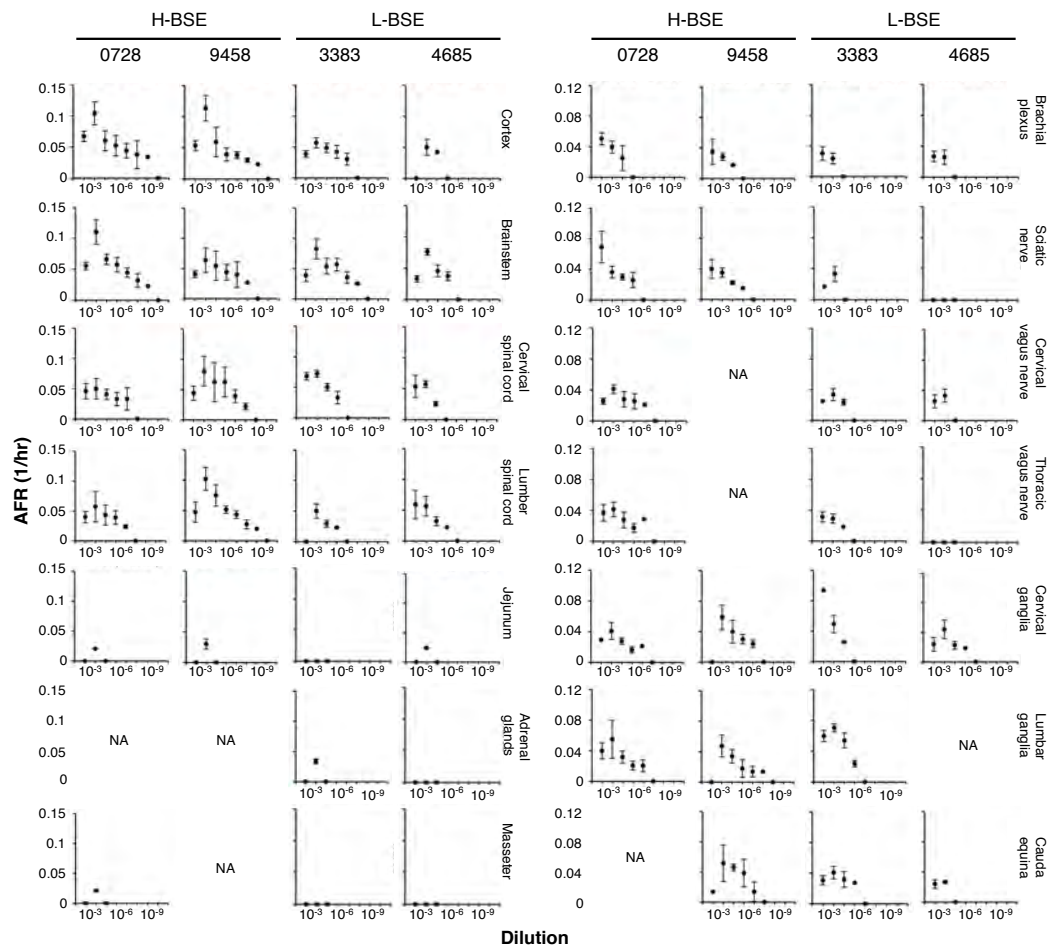


図2 RT-QuIC 法による H-BSE および L-BSE 実験感染牛の各種組織からの PrP^{Sc} の検出。

| Tissue | H-BSE | | L-BSE | |
|--------------------------|---------------------|------------------|-------------|---------------------|
| | 0728 | 9458 | 3383 | 4685 |
| CNS | | | | |
| Cortex | 8.14 ± 0.95 | 7.76 ± 1.33 | 6.09 ± 0.73 | 4.98 ± 0.4 |
| Brainstem | 8.12 ± 0.89 | 6.87 ± 0.51 | 6.79 ± 0.59 | 5.86 ± 0.37 |
| Cervical spinal cord | 5.84 ± 0.74 | 7.47 ± 0.46 | 5.80 ± 0.13 | 4.81 ± 0.41 |
| Lumbar spinal cord | 5.99 ± 0.32 | 7.94 ± 0.72 | 4.92 ± 0.46 | 4.79 ± 0.59 |
| Peripheral nerves | | | | |
| Brachial plexus | 4.96 ± 0.3 | 4.04 ± 0.03 | 3.61 | 3.68 |
| Sciatic nerve | 5.30 ± 0.5 | 4.64 ± 0.17 | 4.22 | <3.40 ^{b)} |
| Cervical vagus nerve | 5.61 ± 0.57 | NA ^{c)} | 5.80 ± 0.13 | 4.19 |
| Thoracic vagus nerve | 5.61 ± 1.01 | NA | 4.92 ± 0.46 | <3.40 |
| Cervical ganglia | 5.38 ± 0.67 | 6.52 ± 0.38 | 5.02 ± 0.49 | 5.02 ± 0.44 |
| Lumbar ganglia | 5.90 ± 0.67 | 5.55 ± 0.37 | 6.4 ± 0.67 | NA |
| Cauda equina | NA | 6.46 ± 0.62 | 5.21 ± 0.53 | 3.74 |
| Skeletal muscles | | | | |
| Triceps | <2.60 ^{b)} | NA | <3.40 | <3.40 |
| Semitendinosus | <2.60 | NA | <3.40 | <3.40 |
| Quadriceps | <2.60 | NA | <3.40 | <3.40 |
| Longissimus | <2.60 | NA | <3.40 | <3.40 |
| Masseter | 2.92 | NA | <3.40 | <3.40 |
| Diaphragm | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |
| Alimentary tracts | | | | |
| Jejunum | 2.89 | 3.67 | <3.40 | 3.48 |
| Ileum | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |
| Caecum | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |
| Rectal | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |
| Other tissues | | | | |
| Heart | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |
| Liver | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |
| Adrenal gland | NA | NA | 3.77 | <3.40 |
| Tonsil | <2.60 | <2.60 | <3.40 | <3.40 |

^{a)} Estimated prion titers were expressed as Log (LD₅₀) /g tissues.

^{b)} Prion titers indicated by <2.60 and <3.40 were below the detection limits for H- and L-BSE, respectively.

^{c)} Tissues were not available.

表 1. H-BSE および L-BSE 実験感染牛の各種組織におけるプリオン感染価の推定

2. 異常型プリオンタンパク質試験管内増幅法の改良・異種間変換における性状解析

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 岩丸 祥史 (農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門)

研究要旨

本研究では現状では試験管内変換反応効率が限られているプリオン株の高効率な反応を可能にする PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) 法条件の改良を行い、その改良 PMCA を用いてプリオンの異種動物間伝達のメカニズムやプリオン株の生成メカニズムの解明のため、試験管内で新たに生成した異種間 PMCA 産物の性状解析を行った。まず PMCA 法の改良のため、5 種類の補助的因子 (テフロンビーズ、ジギトニン、合成 polyA、ヘパリン、アルギニンエチルエステル[AE]) を組み合わせ、その異常型プリオンタンパク質 (PrPres) 増幅効率に与える影響を検討した。その結果、ジギトニン、ヘパリン、アルギニンエチルエステルを反応液に加えることで、実験に用いた 10 種類のプリオン株 (C-BSE, H-BSE, L-BSE, typical scrapie, CWD, マウス順化プリオン株[ME7, Chandler, 22L, Tsukuba-2, *E. coli* recombinant PrP^{Sc}]) すべての PrPres の増幅が促進された。次に、3 種類の補助的因子を反応液に加えた改良 PMCA 法を用いて異種間 PMCA を行った。反応シードとして用いたプリオン株は C-BSE, H-BSE, L-BSE, typical Scrapie, CWD の 5 種類、正常型 PrP (PrP^C) のソースとしてはウシ PrP-Tg マウス(TgBo), ヒツジ PrP (ARQ)-Tg マウス(TgOv)、シカ PrP-KI (ノックイン) マウス (KiCe)の各脳乳剤を用いた。その結果、CWD をシード、ウシ PrP^Cを基質とした改良 PMCA 法では C-BSE と非常に性質の似たプリオン株が生じることが判明した。

A. 研究目的

異常型プリオンタンパク質試験管内増幅法の一つである PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification) はプリオン株によって増幅効率が大きく異なることが知られており、効率が限られている株も多いため、本研究では PMCA 法の改良により、非定型 BSE プリオン (L-BSE、H-BSE) や CWD (Chronic wasting disease) 等の定量解析や検出感度の上昇を目的とする。またその改良 PMCA 法を利用したプリオンの異種動物間伝達のメカニズムやプリオン株の生成メカニズムの解明を目的として試験管内で新たに生成した異種間 PMCA 産物の性状解析を行った。

B. 研究方法

1) 効率的な試験管内変換反応を可能にする改良 PMCA 法の確立

5 種類の補助的因子 (テフロンビーズ、ジギトニン、合成 polyA、ヘパリン、アルギニンエチルエステル[AE]) を組み合わせて PMCA 法を行い、その効果を検討した

2) 改良 PMCA 法により生成した異種間 PMCA 産物の性状解析

本実験には、シードプリオン株として C-BSE, H-BSE, L-BSE, typical Scrapie, CWD の 5 種類、正常型 PrP(PrP^C)ソースとしてウシ PrP 発現形質転換マウス(TgBo)BH, ヒツジ PrP (ARQ)発現形質転換マウス(TgOv)BH、シカ PrP 発現ノックインマウス (KiCe)BH を用いた。

次にシード(CWD)/PrP^C ソース(TgBo)の PMCA 産物(CWD/TgBo PrPres)が感染性を保持しているか、感染性を示した場合、どのような性状を示すのかを調べるため、1 回目に増幅した CWD/TgBo PrPres を TgBo マウスに脳内接種した。さらに発

症したマウスの脳組織の病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究課題において、動物実験は農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門の動物実験委員会に申請し、承認を得て実施した。プリオンに感染している試料を用いるのに対し、すべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等ないよう細心の注意を払って行った。

C & D. 研究結果と考察

1) 効率的な試験管内変換反応を可能にする改良 PMCA 法の確立

ポリアニオンや界面活性剤、テフロンビーズ等の補因子が、PMCA 法による異常型 PrP(PrPres)の増幅を促進することが報告されている。しかしながら、それらが様々なプリオン株の増幅に同様の促進効果を示すかはわかっていない。そこで本研究では、まず、5 種類の補助的因子 (テフロンビーズ、ジギトニン、合成 polyA、ヘパリン、アルギニンエチルエステル[AE]) を組み合わせることで、10 種類のプリオン株 (C-BSE, H-BSE, L-BSE, typical scrapie, CWD, マウス順化プリオン株[ME7, Chandler, 22L, Tsukuba-2, *E. coli* recombinant PrP^{Sc}]) の増幅を同一条件で促進することが可能かを調べた。その結果、ジギトニンおよびヘパリン、アルギニンエチルエステルを反応液に加えることで、実験に用いた 10 種類のプリオン株すべての PrPres の増幅が促進されることが明らかになった (図 1)。さらに、ジギトニン、ヘパリンの添加のみで C-BSE, CWD, Scrapie プリオンの高効率変換が可能であること (図 1)、ジギトニン、ヘパリンに加え、AE を添加すると、L-BSE プリオンにおいても PMCA 法における高効率の変換が可能になることが明らかになった (図 2)。

2) 改良 PMCA 法により生成した異種間 PMCA 産物の性状解析

上記 3 種類の補助的因子を反応液に加える改良 PMCA 法を用いて異種間 PMCA を行った (図 3)。本実験には、シードプリオン株として C-BSE, H-BSE, L-BSE, typical Scrapie, CWD の 5 種類、PrP^C ソースとしてウシ PrP 発現形質転換マウス (TgBo)BH, ヒツジ PrP (ARQ)発現形質転換マウス

(TgOv)BH、シカ PrP 発現ノックインマウス (KiCe)BH を用いた。

1 ラウンド目の増幅では、シードプリオン株とソース PrP^C が同種の場合に加え、C-BSE、L-BSE が TgOvBH で増幅し、さらに Scrapie が KiCeBH で増幅が認められた。その後連続増幅を行った結果、6 ラウンド後にはシード(L-BSE)/ PrP^C ソース (KiCeBH)の組合せ以外ですべての異種間増幅に成功した。12 ラウンド後には、シード(L-BSE)/ PrP^C ソース (KiCeBH)の反応でも PrPres の増幅が認められた。以上の結果から、改良 PMCA 法を用いた連続増幅の過程で、シード PrPres の異種 PrP への順化が起り、順化後は同種間増幅と同程度の効率で異種間増幅が可能になると考えられる。

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、C-BSE, H-BSE, L-BSE をシードにして増幅した PrPres は異種間増幅後でもそれぞれの特徴的な分子量を示していた。それに対してそれに対して scrapie の場合は、異種 PrP^C で増幅した PrPres は同種 PrP^C で増幅した PrPres より分子量が大きくなっており、逆に CWD の場合は、分子量は小さくなっていった。したがって、scrapie および CWD プリオンの異種間 PMCA 産物は scrapie および CWD プリオンとは異なる性状を示すことが考えられた (図 3)。

シード(CWD)/PrP^C ソース(TgBo) PMCA 産物に注目し、さらに解析を行った (図 4)。CWD/TgBo PMCA を 4 反復行ったところ、いずれの場合も 5 から 7 ラウンド後に PrPres が出現し、そのバンドパターンはすべて同様であった。CWD/TgBo PrPres のバンドパターンは C-BSE に良く似ていたが、PK 感受性には違いが認められた (図 4)。したがって、CWD/TgBo PrPres と C-BSE/TgBo PrPres は異なる性状を持つ PrPres であると考えられる。このことは、CWD/TgBo PrPres は C-BSE プリオンのコンタミにより増幅したものではないことも意味する。

CWD/TgBo PrPres が感染性を保持しているか、感染性を示した場合、どのような性状を示すのかを調べるため、1 回目に増幅した CWD/TgBo PrPres を TgBo 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 ± 19 日で発症し、C-BSE BH および C-

BSE シード TgBoBH ソース PMCA 産物を接種した TgBo マウスと有意差はなかった (図 5)。CWD/TgBo PMCA 産物接種マウス脳に蓄積した PrPres のバンドパターンは C-BSE PrPres と区別がつかず、その PK 抵抗性も C-BSE PrPres と同程度に高かった (図 5)。さらに病理学的解析を行った結果、空胞変性のリジンプロファイルおよび脳内における PrPres の蓄積パターンも C-BSE BH 接種マウスの場合と非常によく似ていた (図 6)。以上の結果から、ウシ PrP^C をソースとして CWD プリオンを試験管内で連続増幅することにより C-BSE に似た PrPres が増幅し、さらに、その PrPres は生体内で C-BSE プリオンと区別できない程度に順化が進んだと考えられた。

これらの結果は、C-BSE の由来や特性を考察する上で興味深いものである。この現象を説明する仮説として PMCA の過程で CWD プリオンが C-BSE 様 PrPres に変化したのか、CWD 感染脳組織には CWD プリオン以外にごく少量の C-BSE 様プリオンが含まれているのかの二つが考えられ、そのどちらが正しいのかは今後の検討課題である。

E. 結論

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^C を基質とした PMCA では C-BSE と非常に性質の似たプリオン株が生じることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki Y, Ishikawa T, Kamatari YO, Nakagaki T, Takatsuki H, Ishibashi D, Kuwata K, Nishida N, Atarashi R. Identification of Alprenolol Hydrochloride as an Anti-prion Compound Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Mol Neurobiol.*, 56: 367-377, 2019

2. 学会発表

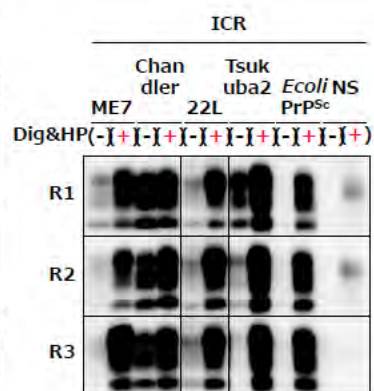
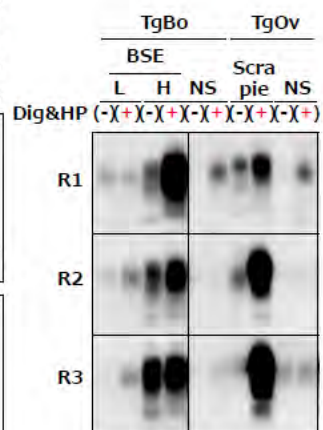
- 1) Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R. I Simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester improves in vitro amplification of PrPSc derived from various prion strains. APPS 2018 (October, 2018, Tokyo, Japan)
- 2) Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R. Highly sensitive detection of PrPSc derived from various prion strains by simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester to protein misfolding cyclic amplification. Prion2018 (May, 2018, Porto, Portugal)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Teflon beads | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| digitionin | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| polyA RNA | - | + | - | + | + | - | + | - | + | - | + | + | - | + | + |
| heparin | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + |



| | L-BSE/TgBo | | | | | NS |
|-----------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Digitonin | (+) | (+) | (+) | (-) | (-) | (+) |
| Heparin | (+) | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) |
| AEE | (+) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |

Digitonin & Heparin & AEE

C-BSE H-BSE L-BSE Scrapie CWD

Bo Ov Ce Bo Ov Ce Bo Ov Ce Bo Ov Ce Bo Ov Ce

R1

R6

R12

kDa

34

28

20

(-) & (-) & (-)

C-BSE H-BSE L-BSE Scrapie CWD

Bo Ov Ce Bo Ov Ce Bo Ov Ce Bo Ov Ce Bo Ov Ce

R1

R6

R12

kDa

34

28

20

图 4

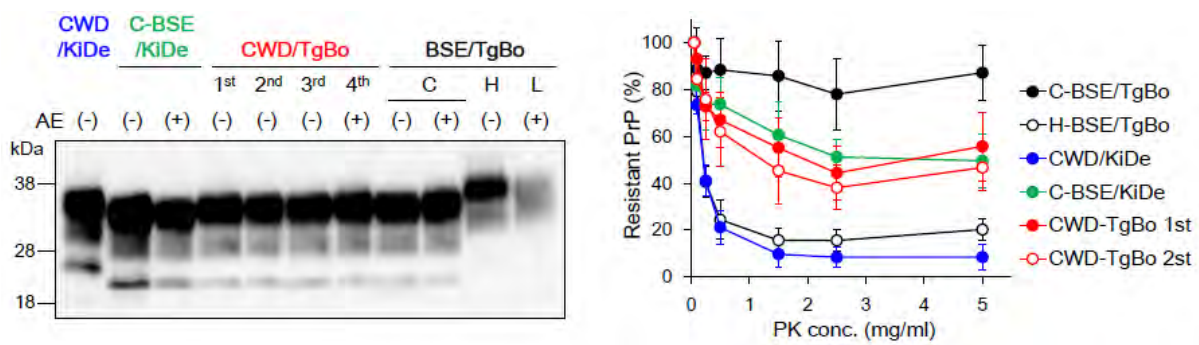


图 5

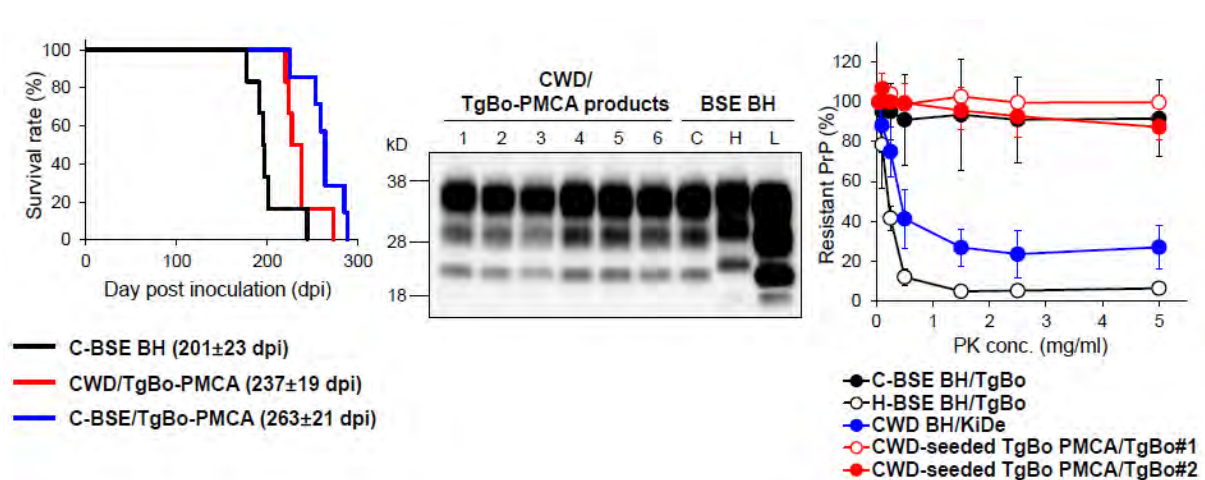
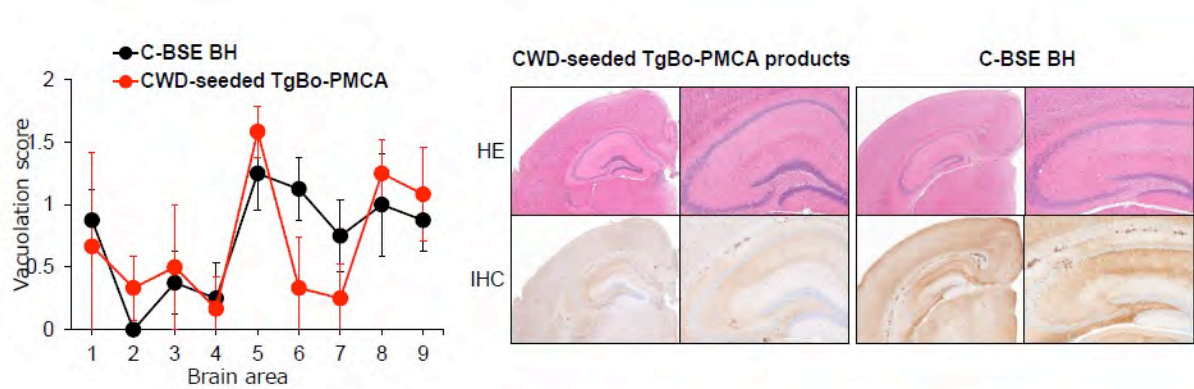


图 6



3. カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価

分担研究者 保富 康宏 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

霊長類医科学研究センター センター長

分担研究者 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ト部門 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及ぼすリスクを評価するために、非定型 BSE 由来プリオンである H-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与した 2 頭のカニクイザルは、接種後 3 年 5 ヶ月を経過したが、発症はみられなかった。また、H-BSE 由来プリオンが霊長類へ伝達した報告がないので、H-BSE 由来プリオンが種の壁を越えて霊長類に伝達するか否かを確認するために、脳内接種したカニクイザル 2 頭も接種後 3 年 5 ヶ月を経過したが、発症はみられなかった。先の実験で L-BSE 由来プリオンを脳内接種したカニクイザルは接種後 2 年以内に発症しており、同じ非定型でも L-BSE と H-BSE 由来プリオンはカニクイザルへの感染性に違いがあることが示唆された。引き続き、H-BSE 由来プリオン感染ザルの経過観察を続けていく。

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。ヒトに近い霊長類を用いて、非定型 BSE プリオンの経口感染実験を行い、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。既に L-BSE プリオンは経口により霊長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への感染はまだ報告がない。そこで、霊長類を用いて H-BSE プリオンの経口投与実験だけではなく、H-BSE プリオンが種の壁を越え霊長類にそもそも感染するか否かを確認するために、H-BSE プリオンの脳内接種実験も行い、H-BSE プリオンのヒトの健康に及ぼすリスクを評価し、安全対策等に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1) 供試動物と接種方法

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター（茨城県つくば市）で出生・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（表 1）。供試動物は、ABSL3 施

設内のアイソレーターにおいて馴化飼育後、感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27℃、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：動衛研）感染ウシの 10%脳乳剤（0.2 mL）をカニクイザル 2 頭（#24、#25）に脳内接種、また 20%脳乳剤（5.0 mL x 8 回）をカニクイザル 2 頭（#26、#27）に経口投与した。

3) 接種および材料採取方法

経口接種は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、前述の量を週 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行った。

接種前及び接種後は約 3 ヶ月おきに血液、脳脊髄液 (CSF)、唾液及び尿の採取を行った。血液は塩酸ケタミン麻酔下で大腿静脈より採取した。CSF は背部剃毛後イソジンで消毒し、第 3 ～ 第 5 腰椎椎間より採取した。

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行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により行う。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行う。

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、再評価を行った。ビデオ撮影は 15 分間実施し撮影開始 5 分後に給餌を行い、摂食行動の観察を行った。神経・精神症状評価の抽出は、下記のヒトプリオン病指標項目について、サルの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、ミオクロームス、姿勢反射障害、動作緩慢、痙性歩行、筋力低下、歩行不能

②精神症状：抑鬱状態、自傷行為、食欲不振、あくび、驚愕反応、不穏

アップルテスト (運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

2. 高次脳機能解析

食物回収試験

食物回収試験は 9 つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9 つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9 つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を 1 試行とし、5 試行実施した。サルの報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入

っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行った。

3. BSE プリオン感染ザルの体液中の PrP^{Sc} 動態解析

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

4. 皮質脳波測定

メデトミジン＋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。測定終了後はメデト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。

(倫理面への配慮)

BSE 接種動物はすべて P3 アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とした。ケージ内にはステンレスの鏡やチェーンを入れると共に、定期的に行うアップルテストや食物回収試験により、ヒトとの触れ合いが福祉向上に有効と考え、ケージ内サルのストレスの軽減に努めた。材料採取及び脳波測定は麻酔下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応および輸液療法等による維持管理を行った。

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

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行った。病

原体の取扱については、医薬基盤・健康・栄養研究所バイオセーフティー委員会の承認を得て行った。

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 3 年 5 ヶ月を経過したが、体重は順調に増加しており (図 1)、運動障害、異常行動は認められず、神経および精神症状共に見られなかった (data not shown)。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 (図 2)。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見られなかった (data not shown)。

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 3 年 5 ヶ月を経過したが、発症はまだ見られていない。ウシへの非定型 BSE プリオンの脳内接種実験の場合、L-BSE プリオンと H-BSE プリオンの潜伏・発症期間に大きな差は無いと報告されているが、我々が以前行った 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、カニクザルに伝達されるが、H-BSE プリオンは L-BSE プリオンに比べ容易にはカニク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ているが、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ことが報告されており、H-BSE プリオンは primate には伝達しにくい、もしくはしない可能性

が示唆される。

E. 結論

非定型 H-BSE プリオン脳内接種または経口投与カニクザルは接種後 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。引き続き、経過観察を続け、H-BSE プリオンのヒトへの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

1) Hagiwara K, Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Okamoto-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. In press.

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

表 1. 非定型 H-BSE 由来プリオン感染カニクイザル個体

| 個体番号 | 性別 | 生年月日 | 系統 | プリオン蛋白 遺伝子型* (コドン 129, 219) | 接種材料 | 接種 ルート | 接種日 |
|------|----|------------|-------|-----------------------------------|----------------------|-----------|------------|
| #24 | ♂ | 2014/2/14 | 混血 | M/M, E/E | Canada 由来 非定型 BSE | 脳内 | 2015/10/26 |
| #25 | ♂ | 2013/12/20 | 混血 | M/M, E/E | ウシ脳乳剤 P2 | 脳内 | 2015/10/26 |
| #26 | ♂ | 2013/11/10 | マレーシア | M/M, E/E | Canada 由来 非定型 BSE | 経口 | 2015/10/26 |
| #27 | ♂ | 2014/5/5 | マレーシア | M/M, E/E | ウシ脳乳剤 P2 | 経口 | 2015/10/26 |

* M: methionine, E: glutamic acid

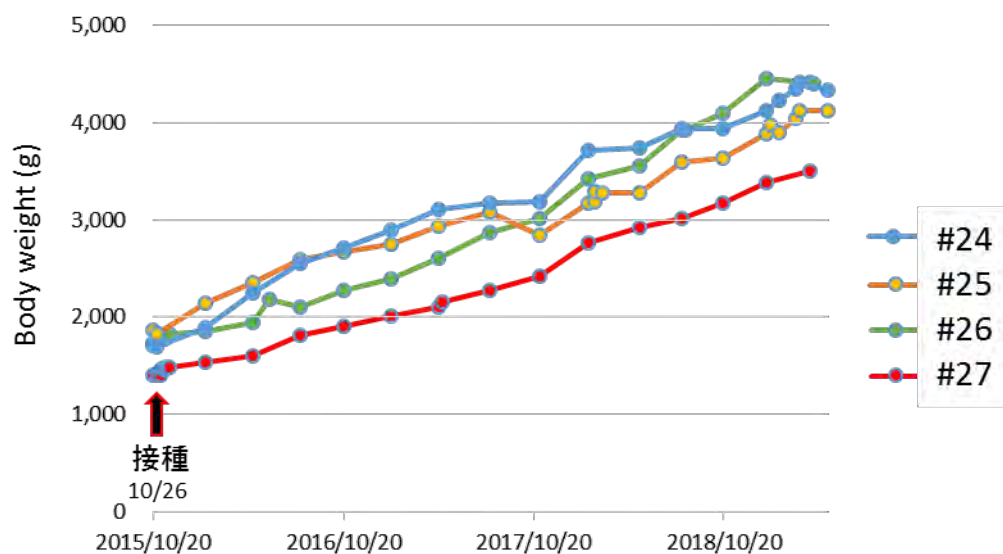
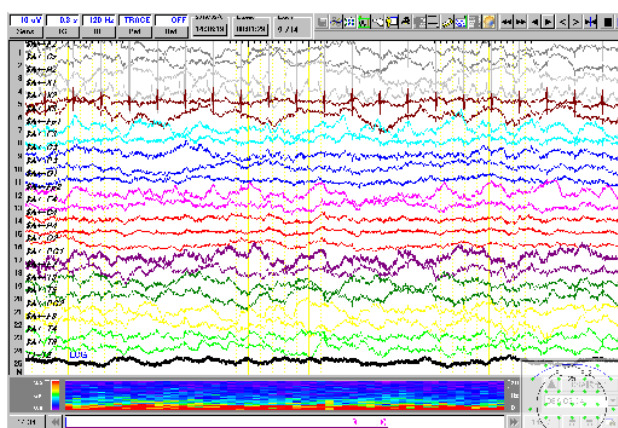


図 1. 非定期 H-BSE 由来プリオン感染カニクイザルの感染後の体重推移
H-BSE プリオン脳内接種ザル (#24、#25)、H-BSE プリオン経口投与ザル (#26、#27)

#24



#25

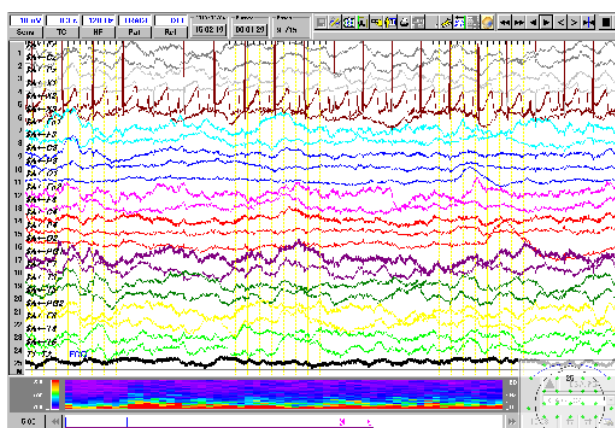


図2. 非定型 H-BSE 由来プリオン感染カニクイザルの皮質脳波

H-BSE プリオン脳内接種ザル（#24、#25）の全身麻酔下での皮質脳波の波形図（脳内接種後 3 年 4 ヶ月）

4. 非定型 BSE 感染カニクイザル の病理学的解析

分担研究者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究協力者 佐藤 由子 (国立感染症研究所・感染病理部)

研究要旨

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。定形 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形 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 80 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形 BSE に加え非定型 BSE が存在することが報告されている。定形 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サ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。

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。

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。

(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 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、神経系組織のみににおいてプリオンが認められた(table 1)。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(fig 1)。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(table 2)。

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 67 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 プリオン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。

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。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Yamaguchi K, Kamatari YO, Ono F, Shibata H, Fuse T, Elhelaly AE, Fukuoka M, Kimura T, Hosokawa-Muto J, Ishikawa T, Tobiume M, Takeuchi Y, Matsuyama Y, Ishibashi D, Nishida N, Kuwata K. A designer molecular chaperone against transmissible spongiform encephalopathy slows disease progression in mice and macaques. Nat Biomed Eng. 2019 Mar;3(3):206-219

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

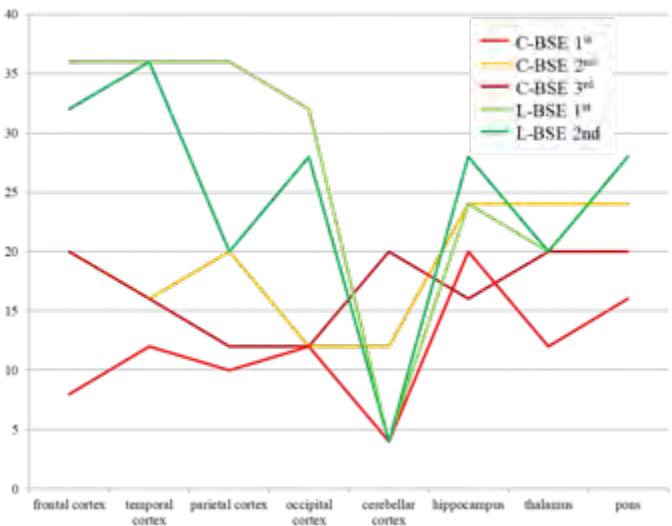
2. 実用新案登録

該当なし

(table 1) L-BSEプリオン 脳内接種サルにおけるプリオンの分布(C-BSEプリオン接種サルとの比較)

| | | L-BSE(1 st and 2 nd) | C-BSE(1 st , 2 nd and 3 rd) | | | L-BSE(1 st and 2 nd) | C-BSE(1 st , 2 nd and 3 rd) | | | L-BSE(1 st and 2 nd) | C-BSE(1 st , 2 nd and 3 rd) |
|------|-----|---|---|------|---------|---|---|-----|-------|---|---|
| 神経系 | 脳 | + | + | リンパ系 | 脾臓 | - | - | 神経系 | 脳神経 | + | + |
| | 心 | + | + | | 扁桃 | - | + | | 正中神経 | + | + |
| | 肝 | - | + | | 脾下リンパ | - | + | | 交感神経 | + | + |
| | 脾 | - | + | | 深部リンパ | - | + | | 副交感神経 | + | + |
| | 消化器 | - | - | | 腋窩リンパ | + | + | | 三叉神経 | - | + |
| | 小腸 | - | + | | 胸腺 | + | + | | 喉神経 | + | + |
| | 盲腸 | - | - | | 結核リンパ | + | + | | 嗅球 | + | + |
| | 結腸 | - | + | | 腸系リンパ | + | + | | | | |
| | 直腸 | - | + | | 腹腔結核リンパ | + | + | | | | |
| | 分泌系 | + | + | | 頸部リンパ | + | + | | | | |
| 内分泌系 | 下垂体 | + | + | その他 | 骨髄腔 | - | - | その他 | 骨髄腔 | - | - |
| | 甲状腺 | - | - | | 皮膚 | - | - | | 皮膚 | - | - |
| | 副腎 | - | - | | 骨髄 | - | - | | 骨髄 | - | - |
| | 性腺 | - | - | | | | | | | | |
| | 副性腺 | + | + | | | | | | | | |
| | 腎上腺 | + | + | | | | | | | | |

(fig 1) 薄髄状変化(%) (薄髄状変化/組織面積)



(table 2) プリオンプラーク数(number/HPF 200倍観察)

| | 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 | none | none |
| parietal cortex | 25 | 20 | 50 | none | none |
| temporal cortex | 5 | 10 | 6 | none | none |
| occipital cortex | 7 | 19 | 25 | none | none |
| cerebellar cortex | 4 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| hippocampus | 5 | 5 | 1 | none | none |

5. カニクイザルへの L-BSE プリオンの経口投与実験（初代） および脳内接種実験（継代）の生化学的解析

分担研究者 萩原 健一 国立感染症研究所・細胞化学部 第1室室長

研究協力者 柴田 宏昭（自治医科大学 先端医療技術開発センター）

小野 文子（千葉科学大学・危機管理学部）

飛梅 実（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨

研究班で進めてきた非定型 L-BSE プリオンを経口投与したカニクイザル 2 個体（#018、#019）の経過観察が終了し、研究分担である中枢神経組織（脳の各部位、脊髄）への PrP^{Sc} の蓄積の有無をウェスタンブロット法により検索した。その結果、調べた組織の PrP^{Sc} は検出限界以下だった。他方、脳内接種により L-BSE プリオンはウシからカニクイザルへ伝播可能である。そこで、ウシからカニクイザルへ L-BSE プリオンを脳内接種した場合に、サルへの伝播・馴化に伴って L-BSE プリオンの病原性が変化するだろうかという点を、近交系マウスに対する L-BSE プリオンの病原性を指標として調べた。その結果、L-型 BSE プリオンをカニクイザルにおいて伝播・増殖させても、伝播後に定型 C-BSE プリオンあるいは C-BSE プリオン様の病原性を有する変異株は出現しないという結果を得た。

A. 研究目的

変異型 CJD (vCJD) との疫学的な因果が確立している C-BSE プリオンと比較して、非定型 L-/H-BSE プリオンについてはヒトへのリスクを含めて未知の点が多い。本研究班のこれまでの研究から、L-BSE プリオンは、ヒト・モデルとしてのカニクイザルへ脳内接種により効率よく伝播することが明らかになっている。このような脳内接種による高い伝播効率を鑑み、研究班では、ヒトが L-BSE プリオンを経口摂取した場合のリスク評価を目的として、カニクイザルへ L-BSE プリオンを経口投与し、経過の観察を続けてきた。L-BSE プリオンを経口投与したサルは観察期間中に外見上の神経症状を呈さず、計画した観察期間に達したために安楽死に処し、観察を終了した。この実験の研究分担として、安楽死後に採材した脳神経組織について、異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積の有無を調べた。

また、L-BSE プリオンを異種動物へ実験的に伝播させると、伝播後の特性が変化するという報告がある。例えば、L-BSE プリオンをヒツジ [Vet Res, 46, 81 (2015)] や近交系マウス [PLoS Pathogens, 3, e31 (2007)] へ実験的に伝播させると、C-BSE プリオンに類似した特性を獲得することが報告されている。本研

究班において、C-型および L-型 BSE プリオンをカニクイザルへ脳内接種により伝播（初代および2継代）させたところ、伝播前の C-型と L-型の PrP^{Sc} の生化学的特性 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動のパターン、プロテアーゼに対する抵抗性) の明らかな違いが、伝播後に消失した。このことは、L-BSE プリオンがヒトを含む霊長類に伝播すると、増殖したプリオンの quassi-species 中に C-BSE プリオン様の病原性を獲得した変異株が新たに生じているのではないかという疑問を投げかけ、もしもそのようなことが起こるならば、ヒトが L-BSE プリオンに感染し、さらにヒトからヒトへの水平感染が起こる場合、水平感染により L-BSE プリオンが変化・変質するかもしれないということを懸念させる。そこで、L-BSE プリオンをカニクイザルからカニクイザルへ 2 継代させた場合に、増殖したプリオンに C-BSE プリオン様の病原性が認められるか否かという点を検討した。

B. 研究方法

1) L-BSE プリオンを経口投与したカニクイザル脳組織等に蓄積する PrP^{Sc} の生化学分析

L-BSE プリオンを経口投与（初回投与）後、飼育・

経過観察を 6 年間続けたカニクイザル(#018、#019)について、脳と脊髄の各部位の PrP^{Sc} の蓄積量を 3F4 抗体を用いるウェスタンブロット法により調べた。対照として、L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルの初代伝播の個体(#014)、L-BSE プリオンを脳内接種したカニクイザルの 2 継代伝播個体(#022)および非感染ザルのそれぞれの神経組織を用いた。

2) カニクイザルで 2 継代増殖させたプリオンについて、近交系マウスを用いたバイオアッセイによる病原性の解析

C-BSE プリオンあるいは L-BSE プリオンを脳内接種によりカニクイザルで 2 継代させた。2 代目のサル(C-BSE プリオン継代ザル #017; L-BSE プリオン継代ザル #022)の脳・前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種し、マウスに対する病原性を比較・追跡した。なお、マウスへの接種に際し、#017 と #022 の前頭葉ホモジネートのプロテアーゼ K 消化物をウェスタンブロット分析にかけ、接種するホモジネート中の PrP^{Sc} のシグナル強度が同等となるようにホモジネート濃度を調節した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルを宿主とするプリオンの感染実験は医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験施設で行い、「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並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省に所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。マウスへの伝播実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省に所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。プリオンの取扱いは、国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」、「実験室安全操作指針」に従った。

C. 研究結果

1) 中枢神経組織(脳の各部位、脊髄)への PrP^{Sc} の蓄積の有無をウェスタンブロット法により検索した。その結果、プリオンに感染していない陰性コントロール・サルの分析結果と同じく、L-BSE プリオン経口投与ザルの神経組織には PrP^{Sc} に由来する陽性シグナル

は検出されなかった[図1、図2]。

2) H28 年度までに、L-BSE プリオンを初代伝播(脳内接種)させたカニクイザルの脳内で、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが新たに出現する可能性は低いことを示した。そこでさらに、本年度はカニクイザルへの 2 代伝播・馴化(脳内接種)後に C-BSE プリオンが出現するかという点を、ウシ L-BSE プリオンをカニクイザルへ 2 継代させた感染ザルの前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種して調べた。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、接種材中にもし 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。経日的に安楽殺させた個体の脳、脾臓、回腸を採材・保管しており、今後、これらの組織中の PrP^{Sc} の有無をウェスタンブロット法により調べる予定である。

D. 考察

L-BSE プリオンの経口投与実験では、食肉衛生検査所で摘発された L-BSE 罹患ウシ(JP24)から調製した 20%脳ホモジネートを 5 mL/回、投与日を隔てて計 8 回(すなわち、組織重量として計 8 g)投与した。この投与量は、先行実施したウシからカニクイザルへの脳内接種実験の投与組織重量(JP24 の 10%脳ホモジネートを 0.2 mL x 1 回接種; すなわち、組織重量として計 20 mg)の 400 倍に相当する。ただし経口投与剤と脳内接種材はホモジネートの調製ロットが異なるので、それぞれの PrP^{Sc} の濃度を ELISA 法およびウェスタンブロット法で定量したところ、組織重量当たりの PrP^{Sc} 濃度は経口投与剤が脳内接種材のおよそ 3/4 倍だった。従って PrP^{Sc} の正味投与量としては、経口投与実験では脳内接種実験の 400x3/4=300 倍の PrP^{Sc} を投与したことになる。

L-BSE プリオンのウシからカニクイザルへの初代の脳内接種実験では、接種後約 2 年でサル 2 個体は神経症状を呈し、安楽死に処した。回腸、脾臓への PrP^{Sc} の蓄積はウェスタンブロット法の検出限界以下であったが、脊髄や脳には PrP^{Sc} が顕著に蓄積して

いた[平成27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 非定型BSE(牛海綿状脳症)に対する安全対策等に関する研究 報告書]。この脳内接種実験とは対照的に、ウシL-BSEプリオンを経口投与した個体は、脳内接種時のおよそ300倍量のL-BSEプリオンを投与したにもかかわらず、観察期間中に明らかな神経症状を呈することなく、安楽死後の脳・脊髄のPrP^{Sc}の蓄積はウエスタンブロット分析の検出限界以下だった。L-BSEプリオンは、カニクイザルへ脳内接種により効率よく伝播するが、今回の実験結果から、カニクイザルをモデルとしたL-BSEプリオンの経口ルートの感染リスクは脳内接種ルートよりも2桁以上低いと見込まれる。ただし、この結果をそのままヒトに適用することについては、慎重であるべきと考える。

L-BSEプリオンを経口投与したカニクイザルがプリオンに感染したという、他の研究グループによる学会発表がある[Comoy, E.E., Transmission studies in primates. Workshop on the epidemiology of human and animal TSEs, 30 April 2010, Torino, Italy]。しかし、この発表の論文等の該当文献を検索しているが見つからず、詳細な情報は不明である。他方、ハイロネズミキツネザル(*Microcebus murinus*)3個体(2ヶ月齢または2歳齢)にL-BSEウシ(8歳齢ウシ, fallen stock)の脳50 mgを経口投与した実験では、2ヶ月齢時に投与した1匹が32ヶ月目に、2歳齢時に投与した1匹が18ヶ月目に、それぞれ神経症状を呈し、安楽死後の分析で脳にPrP^{Sc}の蓄積が認められたことが報告されている[Emerg Infect Dis, 18, 142 (2012)]。本研究班の感染実験で用いたカニクイザルは、プリオン接種・投与時に1.4~2.4歳齢の育成ザル(♂)である。この時期の平均体重は2 kgである[Primate Res, 24, 345 (2009)]。一方、ハイロネズミキツネザルは、誕生時の平均体重 = 6 g、成長後の平均体重 = 65 g [http://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Microcebus_murinus]である。従って体重あたりで比較すると、本研究班のカニクイザルには合計4 mgのウシ脳/g、文献のハイロネズミキツネザルには(体重を10~30gと考えると)1.7~5 mgのウシ脳/g、を経口投与したことになり、ウシ脳組織の投与量は同等である。ヒト、チンパンジー、カニクイザル、キツネザルウシ、ヒツジのプリオン蛋白質のC末端側領域(PrP^{Sc}凝集体のプロテアーゼK抵抗性領域にほぼ相当する領域)の相同性の系統樹をClustal Omegaソフトウェアにより解析すると、キツネザル・プリオン蛋白質がウシ・プリオン蛋白質と強い近縁関係にあるわ

けではない。強いて挙げれば、キツネザルとカニクイザルの内、カニクイザルの方がヒト(とチンパンジー)に対してやや近縁に位置するように見える[図3]。

また、本年度は、L-BSEプリオンがカニクイザルへ伝播することによって、新たにC-BSEプリオンあるいはC-BSEプリオン様の病原性を有する変異株が出現・増殖する可能性について調べた。C57BL/6Jマウスを用いたバイオアッセイの結果、カニクイザルへの伝播後でも両プリオンはマウスに対する固有の病原特性を保たっていることが確認された。このバイオアッセイの結果より、L-BSEプリオンからC-BSEプリオンあるいはC-BSEプリオン様の病原性を有する変異株は出現しないと考えられた。

E. 結論

以下の結論を得た。

- ・ L-BSE プリオンを経口投与したカニクイザル(ウシからサルへの初代投与)について、脳内接種時のおよそ 300 倍量の L-BSE プリオンを投与したが、脳・脊髄の PrP^{Sc} の蓄積はウエスタンブロット分析の検出限界以下だった。
- ・ L-BSE プリオンをカニクイザルへ2代伝播(脳内接種)させても、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンあるいは C-BSE プリオン様の病原性を有する変異株は出現しない。

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

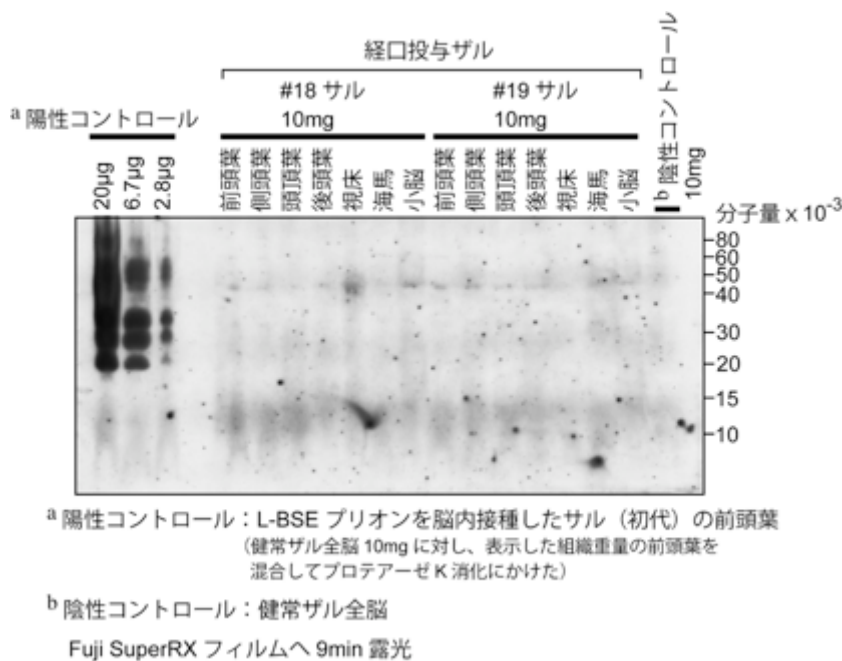


図 1 L-BSE プリオン経口投与ザルの脳の PrPSc

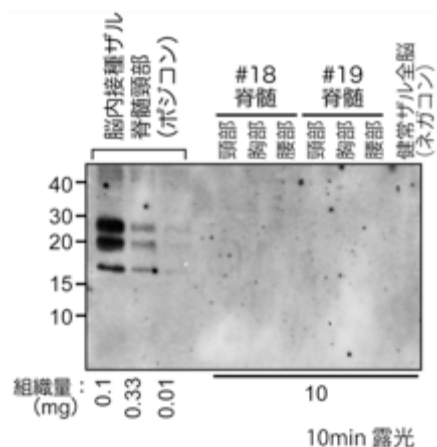


図 2 L-BSE プリオン経口投与ザルの脊髄の PrPSc

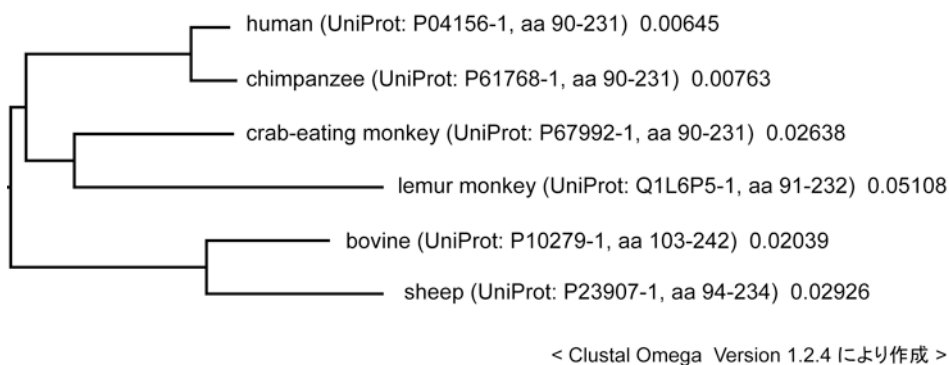


図 3 プリオン蛋白質のコア領域（＝図中の aa で示すアミノ酸配列領域）の系統樹

6. 非定型（H 型）BSE 感染牛の潜伏期間における PrP^{Sc} 蓄積

分担研究者 福田 茂夫 北海道立総合研究機構 畜産試験場 基盤研究部
家畜衛生グループ 主査

研究協力者 岩丸 祥史 （国研）農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
ウイルス・疫学研究領域 感染生態ユニット

研究要旨

脳内接種による BSE 感染により、非定型（H 型）BSE 感染牛の潜伏期間での PrP^{Sc} の脳内出現時期と部位を明らかにする。またこれまでに実施した定型および非定型（L 型）BSE と比較し、BSE の PrP^{Sc} の検出可能な期間を明らかにし、適切な管理措置の策定に貢献する。昨年度作出した非定型 H 型 BSE の脳内接種牛を発症前に病理解剖した結果、接種後 4.7 か月、6.3 か月の大脳髄質、中脳、小脳から微量の PrP^{Sc} をウェスタンブロット法によって検出できた。現行の BSE 検査において、非定型 H 型 BSE の潜伏期間である発症前約 7 か月でも PrP^{Sc} を検出できると示唆された。

A. 研究目的

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

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

本研究では牛への脳内接種による BSE 感染実験により、非定型（H 型）BSE 感染牛の潜伏期間

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

本年度は、昨年作出した非定型 BSE 感染牛を経過観察後、病理解剖し、脳および脊髄等を採取する。採取した材料より、脳内 PrP^{Sc} の出現部位をウェスタンブロット（WB）法で解析する。

B. 研究方法

昨年作出した非定型 BSE 感染牛を経過観察後、動物バイオセキュリティレベル 3 施設において病理解剖し、脳および脊髄を採取した。採取した材料より、PrP^{Sc} の出現部位を WB 法で解析した。検出方法は HRP 標識抗プリオン抗体 T2（×5000）による化学発光法を用いた。

（倫理面への配慮）

サンプル採取および分析は、研究従事者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

C. 研究結果

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(表 1)。病理解剖後、WB 法による PrP^{Sc} 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^{Sc} を検出した(表 2)。

D. 考察

これまでに実施した試験成績および既往の成果より、定型および非定型 BSE のプリオン脳内接種牛の PrP^{Sc} 蓄積時期、発症時期および終末期を比較した(表 3)。Okada らは、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 か月であったと報告している。本試験では接種後 4.7 か月で PrP^{Sc} 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 か月頃に PrP^{Sc} を検出できると考えられた。

E. 結論

以上のように、非定型 H 型 BSE 感染牛では、脳内接種後 4.7 か月で PrP^{Sc} が WB 法で検出可能であったことから、潜伏期間である発症前 7 か月頃に PrP^{Sc} を検出でき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 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

表 1 非定型 H 型 BSE 脳内接種牛の接種後月数、症状および PrP^{Sc} の検出

| 牛 ID | 接種材料 | 接種月 | 解剖 | 接種後月数 | 症状* | PrP ^{Sc} |
|------|---------|--------|-------|--------|-----|-------------------|
| 1608 | H 型 BSE | H30/1 | H30/6 | 4.7 か月 | なし | + |
| 1610 | H 型 BSE | H29/11 | H30/6 | 6.3 か月 | なし | + |

*：調査項目：姿勢、歩様、音や動くものに対する反応など

表 2 非定型 H 型 BSE 脳内接種牛の脳組織における WB 法による PrP^{Sc} の検出

| 牛 No | 前頭部 | | | | 頭頂部 | | 側頭部 | | | 後頭部 | | 小腦 | | 腦幹部 | | | 脊髓 | | | |
|------|-----|------|------|-----|------|----|------|------|----|-----|------|------|----|-----|-----|----|----|------|------|------|
| | 嗅脚 | 大腦皮質 | 大腦髓質 | 線条体 | 大腦皮質 | 視床 | 大腦皮質 | 大腦髓質 | 視床 | 海馬 | 大腦皮質 | 大腦髓質 | 皮質 | 髓質 | 小腦脚 | 中腦 | 橋 | 延髓門部 | 頸膨大部 | 腰膨大部 |
| 1608 | — | — | + | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | + | + | + | — | — | — | — |
| 1610 | — | — | — | — | — | — | — | + | + | — | — | — | — | + | + | + | + | + | — | — |

表 3 定型および非定型 BSE 脳内接種牛の PrP^{Sc} 蓄積時期、発症時期、終末期の比較

| | PrP ^{Sc} 蓄積時期 (検出可) | 発症期 | 終末期 |
|-------------|---------------------------------|---------|---------|
| 定型 BSE | 10 か月* | 18 か月* | 24 か月* |
| 非定型 L 型 BSE | 4.7 か月 | 11 か月* | 16 か月* |
| 非定型 H 型 BSE | 4.7 か月 | 12 か月** | 18 か月** |

*:道総研 福田ら (2009, 2012) **：農研機構 岡田ら (2011)

7. 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 の起源を考察することを目的とし、BSE および L-BSE 株の異種間伝達を計画し、実施した。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って、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か、あるいは維持されるのかを評価した。BSE マウス馴化株(BSEmo) および BSE スナネズミ馴化株(BSEger)の 10%脳乳剤をハムスターに脳内接種したところ、BSEmo、BSEger はハムスターに伝達性を示した。BSEmo 伝達ハムスターでは、脳全体に微細顆粒状や放射状の PrP^{res} の沈着が確認された。また、BSEger 伝達ハムスターでは、脳全体に微細顆粒状や血管周囲への小型斑状の沈着、軟膜下の線状沈着が確認された。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、軟膜下の線状沈着が特徴的であった。異なる馴化株の伝達により、ハムスターの病理像はそれぞれ異なったが、BSEger 伝達ハムスターの病理像は L-BSE 伝達ハムスターのそれに類似していた。

A. 研究目的

本研究は、プリオン株の異種間伝達実験により、BSE と非定型 BSE の関連、およびその起源に関して検討することを目的としている。非定型 BSE は、無糖鎖 PrP^{res} の分子量に基づいて、定型 BSE の 20kDa よりも低分子量 (19kDa) を示す L-BSE と高分子量 (21kDa) を示す H-BSE の 2 種類に大別される。これまでフランスやドイツ、ポーランドなどでは、L-BSE と H-BSE の両方の発生が確認されているが、日本では L-BSE のみが報告されている。BSE と同様、非定型 BSE の起源は明らかでなく、その詳しい性状についてさらなる解明が課題になっている。

これまでの研究から、プリオン感染では伝達可能な種間において、動物種と伝達されたプリオン株の組み合わせにより、病理学的に特徴的な所見を示すことがあきらかになっている。BSE が伝達されたモルモットでは、小脳顆粒層の顕著な脱落と分子層の菲薄化による小脳皮質の萎縮を特徴とし、病変部に一致して顕著なプリオン沈着が認められる。また、PrP^{res} の沈着パターンとして、微細顆粒状の他、プラーク状の沈着が特徴である。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。これに加え、PrP^{res} の海馬への顕著な沈着と血管や神経細胞周囲への小型斑状沈着

が特徴として確認されている。

本研究では、BSE、L-BSE それぞれに伝達性を示した動物種について馴化株を作製し、異なる動物種への伝達を行い、その病理像を比較することで、種間伝達によりプリオン株の表現型の変化を評価し、動物種の影響について検討した。本年度は、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、接種材料および接種方法
シリアンハムスター (Slc:Syrian) を 10 匹使用した。接種材料は、BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株(BSEgu と表記、以下同じ)、BSE マウス馴化株 (BSEmo)、BSE スナネズミ馴化株 (BSEger)を用いて作製した 10%脳乳剤、および感染研より分与された L-BSE 感染ウシ脳材料 (BSE/JP24) 由来の L-BSE ハムスター馴化株(L-BSEham)を用いて作製した 2.5%脳乳剤を使用した。伝達試験の概要は Fig. 1 に示した。

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、麻酔下で

安楽殺し、解剖および採材を行った。
採材した臓器は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、切り出し、再固定を行った。次に98%ギ酸中で1時間振盪し、PrP^{res}の感染性を消失させた。その後、脱水、パラフィン包埋を実施し、3 μ m パラフィン切片を作製後、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 ウサギポリクローナル抗体であるB103抗体、二次抗体にはHRP標識ウサギ抗体 (Dako Envision Kit, DAKO, U.S.A) を用いた。また、PrP^{res}の免疫活性の賦活化には135DWHA法を用いた。

(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

BSEmo 株伝達ハムスター(BSEmo/ham と表記)、BSEgu 株伝達ハムスター(BSEgu/ham)、BSEger 株伝達ハムスター(BSEger/ham)、L-BSE 伝達ハムスター (L-BSEham) では被毛粗剛や沈鬱、歩様異常などの症状が見られた。なお、BSEgu/ham および L-BSEham は対照として用いた。発症個体について病末期までの平均日数は、BSEmo/ham、BSEger/ham でそれぞれ 310 ± 7 日、 450 ± 48.5 だった。対照の BSEgu/ham および L-BSEham は 561 ± 15 、 130 ± 20 だった。

2) 組織学的検索および免疫組織学的検索

BSEmo 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。これらの程度は脳全体で部位による偏りは認められなかった。また、同部位にて、抗PrP抗体を用いた免疫染色によってび慢性や斑状のPrP^{res}の沈着が確認された。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。
BSEmo/ham 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。同部位にて、抗PrP抗体を用いた免疫染色によって微細顆粒状や放射状、び慢性のPrP^{res}の沈着が確認された。PrP^{res}の沈着の程度は、間脳や海馬、中脳においてやや強い陽性を示した。

BSEger 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、同部位にて、抗PrP抗体を用いた免疫染色によって微細顆粒状やび慢性のPrP^{res}の沈着が確認された。PrP^{res}の沈着の程度は間脳においてやや強い陽性を示した。BSEger/ham では、大脳および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おいて、抗PrP抗体を用いた免疫染色によって微細顆粒状、特に血管周囲に斑状のPrP^{res}の沈着が確認された。さらに、大脳皮質軟膜下においてPrP^{res}の沈着が認められ、海馬へのび慢性の顕著な沈着も確認された。BSEgu/ham 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。BSE 伝達モルモットに見られる特徴的な小脳病変が軽度ながらみられた。抗PrP抗体を用いた免疫染色では大脳皮質の軟膜下や海馬において、び慢性に顕著なPrP^{res}の沈着が認められた。血管周囲の斑状、放射状のPrP^{res}の沈着が確認された。PrP^{res}の沈着についてハムスター間の比較をFig. 3に示した。

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微細顆粒状、血管周囲への小型斑状のPrP^{res}の沈着が確認された。PrP^{res}の沈着の程度は、間脳においてやや強い陽性を示した。また、PrP^{res}の沈着はBSE伝達スナネズミと同様に、主に神経細胞周囲に沈着しているものが多かった。また、軟膜下に線状の沈着がみられた (Fig. 2)。

L-BSEham では、大脳および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おいて、抗PrP抗体を用いた免疫染色によって微細顆粒状、特に血管周囲に斑状のPrP^{res}の沈着が確認された。さらに、大脳皮質軟膜下においてPrP^{res}の沈着が認められ、海馬へのび慢性の顕著な沈着も確認された。BSEgu/ham 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。BSE 伝達モルモットに見られる特徴的な小脳病変が軽度ながらみられた。抗PrP抗体を用いた免疫染色では大脳皮質の軟膜下や海馬において、び慢性に顕著なPrP^{res}の沈着が認められた。血管周囲の斑状、放射状のPrP^{res}の沈着が確認された。PrP^{res}の沈着についてハムスター間の比較をFig. 3に示した。

D. 考察

BSE プリオンは多くの動物種へ伝達性を有しているが、ハムスターへは直接伝達性を示さない。今回の研究により、BSE マウス・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。伝達可能な動物での馴化株を使って、通常伝達できない動物へ伝達する試みはBSEやCWDなどいくつかのプリオン株で報告されている。ハムスターへ伝達性を示さない原因とされているハムスターのPrPアミノ酸配列と相同なMH2Mマウスを用いた実験において、一次接種ではBSEプリオンの伝達性を示さなかったが、ICRマウスを経て二次接種したところ、MH2Mマウスに伝達性を示した。今回得られた結果は、これらの報告と一致しており、BSEプリオンが馴化株の動物種により生物学的性状が変化し、伝達性を獲得したことを示した。

プリオン株の病理学的特徴の比較では、BSEmo/hamではBSEmoと同等の空胞変性の程度を示した。BSEmoではPrP^{res}のプラーク状沈着がみられたが、BSEmo/hamではみられなかった。BSEmo/hamでは、BSEmoにはみられなかった放射状沈着が認められた。BSEger/hamでは、BSEgerでみられた特徴的な顆粒状沈着はみられなかったが、空胞変性やPrP^{res}の沈着の程度、微細顆粒

状沈着は共通していた。BSEger/ham では、BSEger では見られなかった血管周囲への斑状の PrP^{res} 沈着や軟膜下の線状沈着が認められた。今回の検索では、BSE マウス株やスナネズミ株の病理学的特徴の多くが、ハムスターに伝達されると維持されないことが明らかとなった。BSEmo/ham、BSEger/ham、BSEgu/ham、L-BSEham の4つを比較すると、空胞変性の度合いや、PrP^{res} の沈着分布は異なり、同じハムスターでも、株が異なれば、病理学的特徴に違いが生じることが確認された。一方、BSEger/ham にみられた PrP^{res} の沈着パターンは、L-BSEham のパターンに極めて類似した結果が得られた。

本研究では、BSE と L-BSE が牛以外の異種動物に伝達され、それがさらに牛に再び伝達された際に、その牛が BSE の特徴あるいは L-BSE の特徴を示す可能性を検証している。ウシを用いた過去の報告では、BSE と L-BSE のウシの病態が同じになるような結果は得られていないが、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。これらより動物種によって PrP^{res} の変化の容易さ、さらに PrP^{res} の表現型の変化の方向性（定型 BSE の表現型の特徴を得るか、または新たな表現型を発現するか）が異なると考えら

れる。

E. 結論

BSE スナネズミ馴化株は伝達ハムスターは、L-BSE 伝達ハムスターに類似した病変を示した。このことから、異なる動物種を介することで、BSE プリオン由来株は L-BSE プリオンに類似した病変を作ることが明らかとなった。

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

Fig. 1. 黄色部分については対照動物。本年度の結果として、BSE マウス馴化株、スナネズミ株からハムスターからハムスターへの伝達が可能であった。



Fig. 2.

右から BSE マウス馴化株(BSEmo と表記)、BSEmo 伝達ハムスター(BSEmo/ham)、BSE スナネズミ馴化株 (BSEger)、 BSEger 伝達ハムスター (BSEger/ham)の抗 PrP 抗体による免疫染色。上から小脳、海馬、大脳皮質、特徴的なパターンを示す。

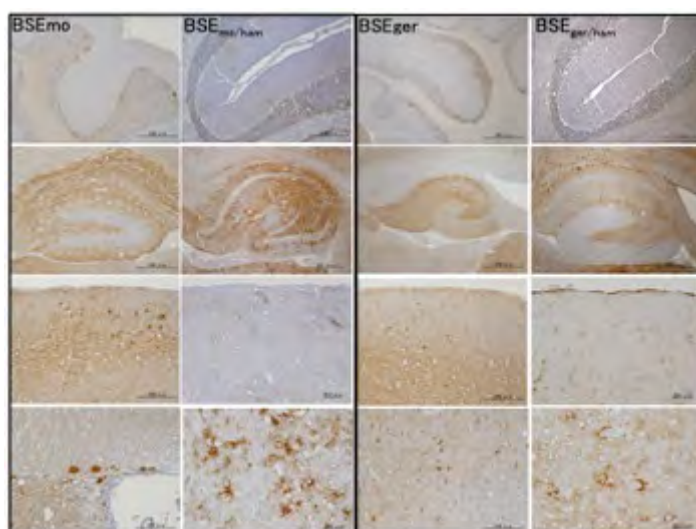
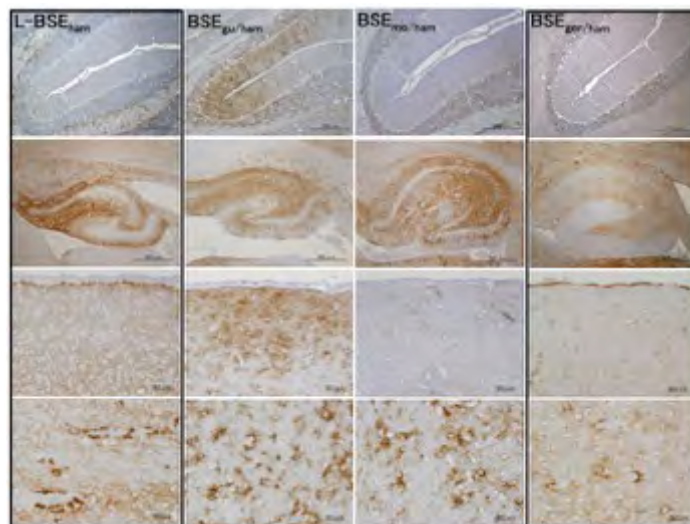


Fig. 3.

右から L-BSE 伝達ハムスター(L-BSEham と表記)、BSE モルモット馴化株伝達ハムスター (BSEgu/ham)、BSEmo/ham、BSEger/ham。上から小脳、海馬、大脳皮質、特徴的なパターンを示す。



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

分担研究者 松浦 裕一 農研機構動物衛生研究部門主任研究員

研究協力者 岩丸 祥史 (農研機構動物衛生研究部門・越境性感染症研究領域)

宮澤 光太郎 (農研機構動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域)

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最終目的とする。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 H-BSE プリオン感染価は、脳と比べて低いことが考えられた。

A. 研究目的

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

本年度は、H-BSE 実験感染牛の末梢組織に分布するプリオンの感染価を算出した。

B. 研究方法

H-BSE を実験感染した発症期のウシから 12 箇所 10%組織乳剤を作製した。末梢神経系組織：迷走神経 (頸部と腹部)、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。それぞ

れの 10%組織乳剤をウシ型 PrP 発現トランスジェニック Tg マウスの脳内に投与した。Tg マウスを週 3 回観察し、行動異常やふらつきなどの神経症状が観察された時点で安楽死した。ウェスタンブロット法や免疫組織化学染色で脳に異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が検出された Tg マウスを BSE 感染陽性として、脳内投与後安楽死までの日数 (潜伏期間) を求めた。

(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 Tg マウスは投与後 500 日を経過した。これまでの各組

組織のプリオン感染陽性マウス数を表にまとめた。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 ± 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 ± 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。

D. 考察

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。H-BSE プリオンの用量反応標準曲線 [$Y_1 = 19.32 + (-0.046) \times X$ ($1 < X < 329$) ; $Y_2 = 4.4 + (-0.0054) \times X$ ($329 < X < 800$) ; X: Tg マウスの潜伏期間、Y: 感染価の対数 (相関係数 $R^2 = 0.9676$)] を用いると、副腎や頸部迷走神経にそれぞれ $10^{2.2}$ LD₅₀/g もしくは $10^{2.1}$ LD₅₀/g の感染価が体内分布すると考えられた。脳では $10^{7.4}$ LD₅₀/g の感染価であったことから、上記組織には脳と比べて 1/100,000 より低いことが考えられた。

一方、BSE 陽性マウスが検出されない組織投与群についても、プリオン感染性の有無を評価するためには経過観察を続ける必要がある。

E. 結論

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 より低いことが考えられたが、ほかの組織についてもプリオン感染性の有無を評価することを必要とする。

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ない。

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

表 H-BSE 実験感染ウシの組織での BSE プリオン感染性

| H-BSE 実験感染牛 の末梢組織 | 投与 マウス数 | BSE 陽性数 | 陰性数 | 生存数 (投与後 500 日現 在) |
|----------------------|------------|------------|-----|--------------------------|
| 迷走神経頸部 | 5 | 4 | 0 | 1 |
| 迷走神経胸部 | 6 | 0 | 3 | 3 |
| 副腎 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| 最長筋 | 5 | 1 | 0 | 4 |
| 大腰筋 | 6 | 0 | 1 | 5 |
| 上腕三頭筋 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 半腱様筋 | 6 | 0 | 0 | 6 |
| 大腿四頭筋 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 咬筋 | 5 | 0 | 1 | 4 |
| 舌下腺 | 5 | 0 | 2 | 4 |
| 耳下腺 | 6 | 0 | 2 | 4 |
| 下顎腺 | 6 | 0 | 0 | 6 |

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

| | |
|-------|--|
| 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 |
| 研究協力者 | Editha B Sabellano (Sabellano Meat and Poultry Processing plant, Philippines) |
| | Emy Fabian、Eduardo Oblena、Clarita M Sangcal、Ernestro S. Gonzales (National Meat Inspection Service, Philippines) |
| | 重松 幸正、小原 和仁 (公益社団法人 全国食肉学校) |
| | 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) |
| | 堀内 基広 (北海道大学大学院・獣医学研究院) |
| | 中山 達哉 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部) |
| | 齊藤 伸明 (岩手県食肉衛生検査所) |
| | 高田 清己、大池 裕治 (岩手県獣医師会食鳥検査センター) |
| | 安達 俊輔、月森 綾子 (島根県食肉衛生検査所) |
| | 吉岡 拓治、明石 誠、堀畑 貴子、横山 泰、神尾 隆昌 (千葉県東総食肉衛生検査所) |
| | 井上 圭子、石井 生代、小川 寿宏 (徳島県食肉衛生検査所) |
| | 黒川 真実子、小菅 達也、樋熊 原野 (富山県食肉衛生検査所) |
| | 上杉 晶、後藤 こず恵 (新潟県新発田食肉衛生検査センター) |
| | 唐沢一宏、細谷 美佳子、齊藤 こずえ、大森 寿志、松井 絵美、 原 智之 (新潟県長岡食肉衛生検査センター) |
| | 清水 秀樹、八重 森恵子 (山梨県食肉衛生検査所) |
| | 柳澤 幸雄、森田 聡志、一川 仁美、吉田 梨花、宮川 明日香、 加藤 愛里、山原 絹子 (日本大学・生物資源科学部) |

研究要旨

我が国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する基礎研究等を実施した。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ルを完成させ、牛処理場 8 カ所、豚処理場 10 カ所、および鶏処理場 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ルを試行した。拭取法は多くの自治体で採用可能であると思われた。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であると思われた。牛・豚・鶏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・食鳥処理場の内部検証、外部検証では、我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。我が国においてもと畜場・食鳥処理場への 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る。そこで、本研究では拭取り法と切除法の比較を行った。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、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。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。このことから、上記プロトコルには、切除法を用いることが適していると考えられた。また、欧米や EU で採用しているゼロトレランス（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。

熟成肉の細菌検査結果から、熟成前の枝肉に比べ、同枝肉を熟成した後に、牛、豚ともに一般細菌数の増加が認められた。熟成前に病原細菌に汚染されていた場合、あるいは、熟成庫内が病原細菌により汚染されている等、衛生管理が悪い場合には、病原細菌が増殖する可能性があると思われた。

A. 研究目的

HACCP は危害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 月に食品衛生法が改正され、あらゆる食品業種に HACCP 導入が義務化されることの方針が明確になった。食肉・食鳥肉事業も同様である。

HACCP 導入による「食肉の安全性の向上」効果を評価するための科学的手法の確立が必須となる。わが国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、国際的協調性を持ちながらかつ我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する必要がある（図 1）。欧米では細菌を用いた HACCP 効果検証方法が確立されているが、施設の規模や処理頭数の異なるわが国のと畜場、ならびに食鳥処理場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）、および食鳥処理場（鶏）を対象として、HACCP 導入時および運用期間におけるその効果の科学的検証方法の確立を目的とし、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・食鳥処理場で実施し、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する。平成 29 年度では、わが国において、牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場（牛の処理 2 カ所、豚の処理 2 カ所）、並びに大規模食鳥処理場（2 カ所）において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行程、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、プロトコルを作成した。本年度は作成したプロトコルを牛 8 施設、豚 10 施設、鶏 4 施設にて試行していただき、作製したプロトコルの理解の容易さ、操作性、記録の容易さを検証した。プロトコル試行の前後でアンケートをとり、プロトコルの質の向上を目指した。試行したプロトコルを資料として付する（資料 1）。

現在、わが国では、牛肉においては、一定期間

保冷库等の中で熟成させることにより、独特のうまみや風味が生まれる熟成肉が注目を集めている。熟成工程では、内在性酵素の作用により一部のタンパク質や核酸を分解することによって、“うまみ成分”が産生されることが期待されている。細菌学的には、食肉加工製品の加工工程において、乳酸菌等の有用細菌数が増加することで、腐敗細菌を減少させる効果があることも報告されている。一方、平成 30 年 2 月、東京都健康安全研究センターは「ドライエイジング製法」により熟成させた牛肉から、食中毒起因細菌を検出したことから、食中毒被害が懸念され、社会的にも大きな話題となった。牛肉の熟成については法的な定義や規格基準もなく、衛生管理のポイントや二次汚染対策等十分な対策が必要となる。本研究では、食肉の熟成効果を検討するため、熟成前後において衛生指標細菌数の測定、食中毒起因細菌の検出を検討し、熟成肉における衛生状況を細菌学的に評価することを実施した。

B. 研究方法

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

平成 29 年度の厚生労働省の「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」に引き続き、平成 30 年度は全国食肉衛生検査所協議会主催で HACCP 平準化研修、「と畜場等での内部検証と外部検証（微生物検査による検証）」を実施した。また、平成 30 年度食肉衛生技術研修会(厚生労働省主催)等で使用する資料の一部を作成した。

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試行

1) 検査対象施設

わが国の牛、豚をそれぞれ対象とした各 2 カ所のと畜場（牛：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）を対象とした。なお本研究では、総務省統計局における地域区分において、「南関東」、「北関東・甲信」を「関東」、「北陸」「東海」を「中部」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）

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）」を作成した（資料 1）。

3) 事前、ならびに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プロトコール（案）」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（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プロトコール（案）」の試行試験実施後に、事後アンケート（資料 2）を実施し、事前準備、試験実施、結果報告書書式、について、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後、Mann-Whitney U 検定により行った。本研究では、検出限界未満、および検出限界超となった検体については、それぞれ 0 cfu/cm²、および 25,000 cfu/cm²として扱った。

③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

1) 検査材料

牛：A と畜場で処理された牛枝肉 10 本を使用した。それぞれの枝肉は、およそ 1℃条件下で公益社団法人全国食肉学校に搬入され、使用時まで 5℃条件下で保管した。

豚：B と畜場で処理された豚枝肉 3 本を使用した。それぞれの枝肉は、5℃条件下で公益社団法人全国食肉学校に搬入され、使用時まで 5℃条件下で保管した。

鶏：Sabellano Meat and Poultry Processing plant（フィリピン）で処理された中抜きと体 5 検体を使用した。本食鳥処理場は HACCP 導入済みであり、使用中抜きと体はチラー槽による冷却後（塩素濃度 50 ppm 以上で管理、飲用適の水で作られたクラッシュアイスのチラー水への投入で冷却）で、食肉加工ラインに懸垂される前のものをを用いた。

2) 採材方法

拭取法：「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に従い、市販のキット（GSI クレオス製「BM フキトレール A」）による綿棒を用いた拭き取りを実施した。ただし、拭き取り領域は、牛、豚、鶏ともに 25cm²とした。綿棒が枝肉と平行になるように当て、縦横斜め（計 4 方向）、各方向につき 10 往復させて拭き取りを行った。

切除法：切除面積が 5 cm×5 cm のステンレス板（図 2）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。

牛については、各枝肉につき、各採取法により、筋肉 3 カ所、脂肪 2 カ所から採取した（図 3, 4）。豚については、各枝肉につき、各採取法により、脂肪 10 カ所から採取した（図 5, 6）。鶏については、胸部およびモモ部を採取した（図 7）。

3) 衛生指標細菌数の測定

各拭取り材料 1 ml 量を終量 10 ml となるように滅菌 PBS に回収し、10 倍階段希釈液を作成した。切除法により得られた材料は、90 ml の PBS 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。

「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に従い、各指標細菌数を計測した。すなわち、各検体の 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 35℃で 24 時間培養し、それぞれ形成されたコロニー数を計測した。

4) 統計解析

採取方法別の一般細菌数、およ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 検定により行った。本研究では、検出限界未満、および検出限界超となった検体については、それぞれ 0 cfu/cm²、および 25,000 cfu/cm²として扱った。

④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

1) 検査材料

わが国の食肉加工施設 A に搬入された牛枝肉 5 件体、および、豚枝肉 5 検体を本研究に使用した。牛、豚ともに、雌を用いて、牛では、134～172 月齢、豚は全て 181 日齢であった（表 2）。

2) 衛生指標細菌数の測定

150 g 量の各肉を無菌的にホモジェナイザーカップに採取し、等量の滅菌 PBS を加え、5,000 rpm で 3 分間、ホモジェナイズ処理を行い、50%乳剤とし、衛生指標細菌数の測定、ならびに各種病原細菌の検出に使用した。

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。

50%乳剤とした各検体をさらに PBS で 5 倍に希釈（最終 10 倍希釈）した。さらに必要に応じて、PBS で 10 倍希釈した。希釈した各検体 1 ml 量を、各条件につき 2 枚ずつのペトリフィルム（AC プレート：一般細菌用、EC プレート：大腸菌群/大腸菌用、EB プレート：腸内細菌科菌群用）にそれぞれ接種した。AC プレートは 35℃で 48 時間、EC、および EB プレートは 35℃で 24 時間培養し、それぞれ形成されたコロニー数を計測した。

3) サルモネラ属菌の分離培養

平成 26 年度食品の食中毒汚染実態調査における検査法（NIHSJ-01 法）に従った。

すなわち、50%乳剤 50 ml を、緩衝ペプトン水（BPW）200 ml に加え、37℃、22±2 時間培養した（前増菌培養）。選択増菌培養には、ラバポート・バシリアディス培地（RV 培地）およびテトラチオネート培地（TT 培地）を使用し、42℃、22±2 時間培養した。さらに、選択分離培地には、MLCB およびクロモアガーサルモネラ（CHS）を用いて、37℃、22±2 時間培養した。MLCB 上の黒色コロニー、CHS 上の藤色コロニーを 3 株ずつ釣菌し、TSI 培地および LIM 培地に接種し、37℃、22±2 時間培養した。TSI 培地で高層/黄変・黒変・ガス産生、斜面/赤変、LIM 培地で紫変、運動性陽性、インドール反応なしが確認された株をサルモネラ属菌とした。

4) リステリアの分離培養

NIHSJ-08 法に従った。

すなわち、50%乳剤 50 ml を、half-Fraser 液体培地 200 ml に加え、30℃、24 時間培養した（一次選

拭培地)。二次増菌培地として、Fraser 液体培地に接種し、37℃、48 時間培養したもの、および二次増菌培養をしなかったものを調整した。各増菌培養後の材料をクロモアガーリステリア (CHL) に接種して、37℃で 24、および 48 時間好気培養を、あるいは PALCAM 寒天培地に接種して、37℃で 48 時間微好気培養した。CHL 上で、乳白色のハローを伴った青緑色のコロニー、PALCAM 寒天培地上で、褐色～黒色のハローを呈する灰色から濃オリーブグリーン色のコロニーがそれぞれ形成された場合、リステリアの定型集落とした。

5) 志賀毒素産生大腸菌 (STEC) の分離培養

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査マニュアル (2017 年 2 月改定、国立感染症研究所) に従った。

すなわち、STEC の分離には、50%乳剤の 1 白金耳量を直接 MacConkey 培地およびクロモアガー STEC 培地に塗布し、37℃で 24 時間分離培養を行った。O157 STEC (O157) の分離には、50%乳剤 50 ml をノボビオシン加 mEC 200ml に接種し、42℃で 18 時間増菌培養を行った。増菌培養後、1 白金耳量をクロモアガー O157 培地および CT-SMAC 培地に塗布し、37℃で 24 時間分離培養を行った。さらに、免疫磁気ビーズ O157「生研」(デンカ生研株式会社) を用いて増菌培養液中の O157 を濃縮した後、その 1 白金耳量をクロモアガー O157 培地および CT-SMAC 培地に塗布し、37℃で 24 時間分離培養を行った。MacConkey 培地において赤色を呈したコロニー、クロモアガー STEC 培地およびクロモアガー O157 培地において紫色を呈したコロニー、CT-SMAC 培地において無色を呈したコロニーを釣菌した。得られた株から DNA を抽出し、PCR 法により *stx1* あるいは *stx2* の少なくともいずれか一方が検出された株を STEC とした。

6) 黄色ブドウ球菌の分離培養

直接平板培養法 (NIHSJ-03 法) を一部改変して行った。

すなわち、50%乳剤の 1 白金耳量を卵黄加マンニット食塩寒天培地に接種し、37℃、44±4 時間培養した。マンニット分解、卵黄反応陽性の株を黄色ブドウ球菌の定型集落とした。

⑤鶏と体からのカンピロバクターの検出

鶏と体の拭取り液 200 μ l を、CCDA 寒天培地 (関東化学) およびクロモアガーカンピロバクタ

ー (関東化学) の寒天上に塗布した。寒天培地を、微好気性培養 (アエロパック微好気) し、コロニーの出現を確認した。別に、拭取り液 100 μ l をブチットカンピロ/10 (日研生物医学研究所) 10 ml に接種し、24 あるいは 48 時間増菌培養し、上記の寒天培地 2 種類に 100 μ l 塗布し、微好気性培養後の後のコロニー出現の有無を確認した。

C. 研究結果

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

「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の一部について掲載する (図 8)。

スライド 1 : 米国食品安全検査局 (FSIS) ではと畜場が実施する内部検証、検査所が実施する外部検証ともに、牛では 3 か所 (肛門周囲、ともばら、胸部) を各々 100 cm^2 ずつ計 300 cm^2 について実施している。検査法はスポンジ法と切除法である。

スライド 2 : 米国食品安全検査局 (FSIS) ではと畜場が実施する内部検証、検査所が実施する外部検証ともに、豚では 3 か所 (ともばら、胸部、頸部) を各々 100 cm^2 ずつ計 300 cm^2 について実施している。検査法はスポンジ法と切除法である。

スライド 3 : 米国食品安全検査局 (FSIS) では食鳥処理場が実施する内部検証、検査所が実施する外部検証ともに、リンスパック法で実施している。

スライド 4 : 米国食品安全検査局 (FSIS) では切除法による内部検証の判定方法を合格判定値 (m)、条件付き判定値 (M)、検体数 (n)、条件付き合格範囲の検体数 (c) で決められている。

スライド 5 : 米国食品安全検査局 (FSIS) ではスポンジ法による内部検証の判定方法は過去 1 年間の当該施設における検査結果の標準偏差 (SD) を算出し、基準値 (平均値 \pm 2 SD または平均値 \pm 3 SD) を設定し評価をしている。

スライド 6 : EU 規則では牛及び豚については、とさつ、解体後、冷却前の枝肉 (4 か所から計 100 cm^2 採取)、鶏については、冷却後の食鳥と体 (3 体の頸皮から計 25 g) から検体採取し、切除法で実施している。

スライド 7 : 牛枝肉を用いて、世界で普及している切除法と我が国で実施している拭き取り法の比較を実施した。

スライド 8 : 牛の筋肉部の「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて 25 倍、一般生菌数が多い。牛

の脂肪部の「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて 1,271 倍、一般生菌数が多いという結果であった。

スライド 9：豚枝肉を用いて切除法と拭き取り法の比較を実施した。

スライド 10：豚枝肉の「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて 64 倍、一般生菌数が多いという結果であった。

スライド 11：鶏中抜きと体を用いて切除法と拭き取り法の比較を実施した。

スライド 12：鶏中抜きと体の「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて 25 倍、一般生菌数が多いという結果であった。

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試行

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(資料 2-2, 2-3)。その結果、事前準備における問題点としては、従来法に比べ、新たに購入する機材・消耗品があったとした施設が 2 施設あった(資料 2-2)。また、試験の実施時では、協力施設への依頼時に問題があったとの回答が 1 施設、施設規模に比べ、検討する検体数が多く、実施が困難であったとの回答が 2 施設認められた。また、結果報告の書式については、6 施設から、改善が必要との回答であった。具体的なコメントは、資料 2-3 に示す。

牛：本研究で検討した、7 施設で 5 回実施(施設「中国・四国 4」については、3 回実施し、このうち、1, 3 回目は 1 頭、2 回目は 2 頭のみ実施したため、参考値とした)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/cm²)の最小値、最大値、平均値、および中央値を表 3 に示す。各施設における検体の一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数について、正規性検定を実施したところ、正規分布に従うものではなかったことから、以降の検定は、Mann-Whitney U 検定により実施した。

各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、全施設における値(一般細菌数：42.8 cfu/cm²、腸内細菌科菌群：ud)と比較したところ、「中部 1」の一般細菌数(590.0 cfu/cm²、p=0.000)、腸内細菌科菌群数(ud、p=0.000)は有意に高く、また、「中部 2」の一般細菌数(12.1

cfu/cm²、p=0.016)、「中国・四国 3」の一般細菌数(5.0 cfu/cm²、p=0.000)は、それぞれ有意に高い値を示した(表 3)。

各施設の HACCP 導入状況別、ならびに年間処理頭数別、および HACCP 導入状況/年間処理頭数別に比較した(表 4)。

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/cm²)、および腸内細菌科菌群数(ud)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/cm²)、および腸内細菌科菌群数(ud)に比べ、有意(それぞれ p=0.000, p=0.000)に低い値となった。

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/cm²)、および腸内細菌科菌群数(ud)は、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/cm²)、および腸内細菌科菌群数(ud)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/cm²)、および腸内細菌科菌群数(ud)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/cm²)、および腸内細菌科菌群数(ud)に比べ、有意(それぞれ p=0.000, p=0.000)に高い値となった。

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/cm²)、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/cm²)に比べ、有意(p=0.000)に低い値を示したが、腸内細菌科菌群数(いずれも ud)に有意差は認められなかった。

豚：本研究で検討した、10 施設で 5 回実施(施設「中国・四国 3」については 6 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/cm²)の最小値、最大値、平均値、および中央値を表 5 に示す。各施設における検体の一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数について、正規性検定を実施したところ、正規分布に従うものではなかったことから、以降の検定は、Mann-Whitney U 検定により実施した。

各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、全施設における値(一般細菌数：23.9 cfu/cm²、腸内細菌科菌群：ud)と比較したところ、「関東 1」の一般細菌数(207.0

cfu/cm²、 $p=0.000$)、腸内細菌科菌群数(2.5 cfu/cm²、 $p=0.000$)、「中国・四国 1」の一般細菌数 (101.0 cfu/cm²、 $p=0.001$)は有意に高く、「東北 1」の一般細菌数 (9.6 cfu/cm²、 $p=0.001$)、「中部 2」の一般細菌数 (13.2 cfu/cm²、 $p=0.025$)、「中国・四国 2」の一般細菌数 (9.0 cfu/cm²、 $p=0.018$)、「中国・四国 4」の一般細菌数 (9.2 cfu/cm²、 $p=0.007$)は、それぞれ有意に低い値を示した (表 5)。

各施設の HACCP 導入状況別、ならびに年間処理頭数別、および HACCP 導入状況/年間処理頭数別に比較した (表 6)。

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/cm²) 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/cm²) に比べやや低値を示した ($p=0.028$)。腸内細菌科菌群数はいずれも ud となり、有意差は認められなかった。

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/cm²)、および腸内細菌科菌群数 (ud) 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/cm²)、および腸内細菌科菌群数 (ud) に比べ、有意 (それぞれ $p=0.000$ 、 $p=0.025$) 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/cm²、 $p=0.000$) を示したが、腸内細菌科菌群については、37,500 頭未満の施設 (2 施設、50 検体) に比べ、有意に高値(ud)を示した。

HACCP 導入状況/年間処理頭数別の比較では、HACCP 未導入の施設では、年間処理頭数 37,500 頭未満の施設 (1 施設、25 検体) における一般細菌数 (9.0 cfu/cm²) は、37,500 頭 ~100,000 の施設 (3 施設、75 検体 ; 56.5 cfu/cm²) に比べ、有意 ($p=0.000$) に低値を示した。HACCP 導入済みの施設では、年間処理頭数 37,500 頭未満の施設 (1 施設、25 検体) における一般細菌数 (9.2 cfu/cm²)、および 100,000 以上の施設 (2 施設、54 検体 ; 11.9 cfu/cm²) は、37,500 頭 ~100,000 の施設 (3 施設、75 検体 ; 35.0 cfu/cm²) に比べ、有意 (それぞれ $p=0.002$ 、 0.005) に低値を示した。

さらに、年間処理頭数 37,500 ~100,000 頭の施設における腸内細菌科菌群数において、HACCP 未導入の施設 (ud) に比べ、HACCP 導入済みの施設 (ud) では、有意 ($p=0.021$) に高値を示した。

鶏 : 本研究で検討した、4 施設で 5 回実施 (施設

「東北 2」については 2 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/cm²) の最小値、最大値、平均値、および中央値を表 7 に示す。各施設における検体の一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数について、正規性検定を実施したところ、正規分布に従うものではなかったことから、以降の検定は、Mann-Whitney U 検定により実施した。

各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、全施設における値 (一般細菌数 : 34.8cfu/cm²、腸内細菌科菌群 : ud) と比較したところ、「関東 1」の一般細菌数 (79.9 cfu/cm²、 $p=0.000$)、腸内細菌科菌群数 (8.4 cfu/cm²、 $p=0.000$) は、それぞれ有意に高値を示した (表 7)。一方、「東北 1」の一般細菌数 (ud、 $p=0.001$)、「東北 2」の一般細菌数 (6.0 cfu/cm²、 $p=0.002$) は有意に低値を示した。

本研究で検討した施設は、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 (表 8)。

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/cm²)、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 (ud)、および腸内細菌科菌群数 (ud) に比べ、有意 (それぞれ $p=0.000$ 、 $p=0.005$) に高値であった。

③検体採取法 (拭取法と切除法) が一般細菌数に及ぼす影響の検討

牛 : 10 本の牛枝肉からそれぞれ拭取法、および切除法により、採材した際の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数を表 9 に示す。6 本の枝肉それぞれ筋肉 3 カ所から拭取法で採取したものでは、ud~2,080.0 cfu/cm²、同切除法では ud~37,440.0 cfu/cm² であった。脂肪 2 カ所から拭取法で採取したものでは、ud~1,000.0 cfu/cm²、同切除法では ud~90,000.0 cfu/cm² 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、大腸菌群は、拭取法、切除法で採取した検体では、すべて ud であった。

豚 : 3 本の豚枝肉からそれぞれ拭取法、および切除法により、採材した際の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数を表 10 に示す。

豚枝肉 #1 (脂肪) では、拭取法で採取した 10 検体の中央値は、1,052.5 cfu/cm²、同切除法では 4,734.0 cfu/cm² で、切除法により採取した検体において有意 (p=0.000) に高い値を示した。豚枝肉 #2 (脂肪) では、拭取法で採取した 10 検体の中央値は、ud、同切除法では 36.3 cfu/cm² で、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。豚枝肉 #3 (脂肪) では、拭取法で採取した 10 検体の中央値は、13.0 cfu/cm²、同切除法では 85.5 cfu/cm² で、切除法により採取した検体において有意 (p=0.022) に高い値を示した。なお、全ての枝肉 (豚枝肉 #1~3) のいずれにおいても、腸内細菌科菌群、大腸菌、大腸菌群は、拭取法、切除法で採取した検体において、すべて ud であった。

鶏：それぞれ 5 羽ずつのと体から、それぞれ拭取法、および切除法により、採材した際の一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数を表 11 に示す。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/cm²、0.6 cfu/cm²、ud、ud であった。切除法では 1,810.3 cfu/cm²、37.5 cfu/cm²、4.1 cfu/cm²、22.9 cfu/cm² であった。同様に、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/cm²、1.0 cfu/cm²、ud、0.4 cfu/cm²、同切除法では 1,812.0 cfu/cm²、38.7cfu/cm²、4.1 cfu/cm²、18.7 cfu/cm² 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い値となったが、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。

④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：5 頭の牛枝肉について、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表 2 に示す。熟成前の枝肉では、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、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。

さらに、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。

豚：5 頭の牛枝肉について、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表 2 に示す。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。

さらに、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。

⑤鶏と体からのカンピロバクター検出

増菌を行わずに鶏と体拭取り液を直接検出用寒天培地に接種した場合、合計 10 検体すべてで、CCDA およびクロモアガーカンピロ寒天培地の 2 種類とも、コロニーは出現しなかった。一方、24 あるいは 48 時間の増菌培養を行うと、寒天培地上にコロニーが出現した。クロモアガーカンピロ寒天培地上のコロニーは明瞭だった。

D. 考察

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

HACCP 導入にあっては、と畜場・食鳥処理場側の従業員の教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育が必要である。米国の牛・豚ではスポンジ法、EU の牛・豚では切除法である。また、米国の鶏はリンスパック法、EU では切除法である。我が国は今まで拭取法が主に実施されており、世界の標準と異なることから、成績を比較することができない。我が国も切除法の導入を考慮に入れるべきであると思われる。また、欧米や EU で採用しているゼロトレランス (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。

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試行

「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」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、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（資料 2-1, 2-2, 2-3）。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) 塩素中和剤の使用方法的説明
- 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ルの改善が必要である。

本研究で各施設から 1 週間に 5 検体、連続する 5 週間の採材、ならびに検査の実施（計 25 検体/施設）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、一部を除き、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、施設の衛生状況进行评估する際には、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。

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したところ、牛、豚、鶏、いずれの施設においても、有意に高い、あるいは、低い一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数を示した施設が認められた。さらに、牛の施設では、HACCP 未導入の施設に比べ、HACCP 導入済みの施設において、一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数の中央値が有意に低値を示した（表 4）。以上のことから、本研究で検証したプロトコルは、各施設における枝肉の

衛生状況进行评估し、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。今後、さらに検討する対象施設等の条件を勘案し、得られたデータの評価をするための判断基準の設定などが必要となる。

牛の施設では、HACCP 導入済みの施設において、年間処理頭数の多くなる施設において、有意に多くの一般細菌数が検出された（表 4）。今後対象施設を拡大し、年間処理頭数と枝肉の衛生状況について、関連性を検討することが必要である。

豚の施設では、年間処理頭数が 37,500-100,000 である施設において、有意に高い一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数が認められた（表 6）。この傾向は HACCP 導入済みの施設に限った場合にも認められた。本研究で対象とした 10 施設のうち、6 施設は、年間処理頭数が 37,500-100,000 であった。さらに 10 施設のうち、一般細菌数の中央値として、有意に高い値を示した施設（「関東 1」、「中国・四国 1」）はいずれも年間処理頭数が 37,500-100,000 のグループに属している。以上のことから、年間処理頭数と枝肉の衛生状況に関連があるのか、あるいは特定の施設の影響によるものか、いずれの可能性も考えられる。今後、対象施設を拡大し、継続的に検討していく必要がある。

本研究で対象とした鶏の施設では、4 施設全てにおいて、HACCP 導入済みの施設であった（表 1）。今後、HACCP 未導入の施設を対象とし、導入後のデータと比較することにより、本プロトコルの有用性を評価する必要がある。一方、年間処理羽数別では、7,500,000 以上の施設が、7,500,000 未満の施設に比べ、一般細菌数、および腸内細菌科菌群数ともに有意に低値を示し、牛の成績と逆の成績となった（表 8）。各施設において実施されている処理方法の詳細を合わせて比較検討し、衛生状況に影響を与える要因について、検証していく必要があるものと考えられた。

③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

米国の牛・豚ではスポンジ法、EU の牛・豚では切除法である。また、米国の鶏はリンスパック法、EU では切除法である。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。

本研究では、牛枝肉 10 本、豚枝肉 3 本、および鶏 5 羽を用いて、同一の枝肉、あるいはと体から、

拭取法と切除法を同時に実施し、比較したところ、いずれも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、一般細菌数、ならびに鶏については、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。

④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

本研究では、熟成前の枝肉に比べ、同枝肉を熟成した後に、牛、豚ともに一般細菌数の増加が認められた。対象とした施設では、骨付きのロースのみを使用し、1℃で牛では31日間、豚では25日間、処理するドライエイジングにより熟成を行っていた。本法は、「肉の水分（自由水と結合水）の活性を促し「微生物」による酵素の働きを導く。こうした作用により、肉の柔軟化、旨味の濃さ、ジューシーさ、芳醇な香りが成果として認められる。」（日本ドライエイジングビーフ普及協会）ことを特徴とする。実際に本研究においても、熟成後では、一般細菌数の大幅な増加が認められた。よって、熟成前に病原細菌に汚染されていた場合、あるいは、熟成庫内が病原細菌により汚染されている等、衛生管理が悪い場合には、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。本研究において、一般細菌として検出された細菌には、各種の有用細菌が含まれる可能性がある。今後、メタゲノム解析により、検出された微生物叢解析を実施し、増殖した微生物叢について、検討する必要があると考えられた。

⑤鶏と体からのカンピロバクター検出

予備的試行の段階であるが、鶏と体拭取り液からカンピロバクターが検出できるか検討した。少数ではあるが、増菌培養を行うと、分離培地上にカンピロバクターを検出した。コロニー数は少なく、検出頻度も低かった。検体の種類や採取法、増菌や分離培地、増菌培養時間等、欧米の手法や、国内で適応されているカンピロバクター検査法

を調査、統合し、食鳥処理場における HACCP システム検証、とくに外部検証法として、カンピロバクターを検査対象とした方法を構築する必要があると考えられた。

E. 結論

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

米国・EU ではと畜場・食鳥処理場の内部検証、外部検証では、我が国で実施している拭取法は実施しておらず、と畜場・食鳥処理場への 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る。また、欧米や EU で採用しているゼロトレランス（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。

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試行

HACCP 導入にあつては、拭取法は多くの自治体で採用可能であると思われた。しかし、今後、下記の問題点を反映させたプロトコールの改善が必要であると思われた。

- 1) 塩素中和剤の使用方法的説明
- 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）

一般生菌数や腸内細菌科菌群によって、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。HACCP システム妥当性検証試験において一般生菌数や腸内細菌科菌群数を用いる微生物学的手法は応用できるものと考えられた。

③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

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、鶏では一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群数について高値を示した。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。

④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

本研究では、熟成前の枝肉に比べ、同枝肉を熟成した後に、牛、豚ともに一般細菌数の増加が認められた。熟成前に病原細菌に汚染されていた場合、あるいは、熟成庫内が病原細菌により汚染されている等、衛生管理が悪い場合には、病原細菌が増殖する可能性があるため、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。

⑤鶏と体からのカンピロバクター検出

増菌培地の有用性を確認した。今後、食鳥処理施設を対象とした外部検証システムの一環として、カンピロバクターを対象とした試験法の確立を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(その他の印刷物)

1. 森田幸雄:腸管出血性大腸菌による食中毒の発生要因と発生予防のための検査、月刊HACCP、24(12)、29-35 (2018)
2. 壁谷英則:と畜場へのHACCP導入の現状とこれからの課題、モダンメディア:64(4)、71-78 (2018)

2. 学会発表等

1. 森田幸雄、食肉の安全・安心の確保について、食品衛生講義、(公社)全国食肉学校主催、群馬県佐波郡玉村町(全国食肉学校)、2018年5月28日
2. 森田幸雄、食品衛生の最近の動向、H30年度衛生講習会、埼玉県衛生研究所主催、埼玉県比企郡(埼玉県衛生研究所)、2018年6月6日
3. 森田幸雄、と畜場、食肉処理場へのHACCP導入について、H30年度食肉衛生検査所研修会、静岡県食肉衛生検査所主催、静岡県掛川市(静岡県食肉衛生検査所)、2018年7月11日
4. 森田幸雄、カンピロバクターの最新知見と食鳥処理におけるHACCPについて、H30年度滋賀県食肉衛生技術研修会、滋賀県食肉衛生検査所

主催、滋賀県近江八幡市(滋賀県食肉衛生検査所)、2018年10月20日

5. 森田幸雄、と畜場等での内部検証と外部検証(微生物検査による検証)、H30年度HACCP平準化研修 北海道東北ブロック、全国食肉衛生検査所協議会主催、秋田県秋田市(秋田ビューホテル)、2018年10月18日
6. 森田幸雄、と畜場、食鳥処理場におけるHACCPの内部検証、外部検証、H30年度 青森県食肉衛生技術研修会、青森県十和田市食肉衛生検査所主催、青森県十和田市(十和田食肉衛生検査所)、2018年10月20日
7. 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、平成30年度食肉衛生技術研修会、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課主催、東京都中央区(東京証券会館)、2019年1月21日
8. 森田幸雄、対米食肉輸出認定施設の衛生管理(と畜検査員向け)、H30年度 輸出対策リーダー養成研修、大分県食肉検査所主催、大分県豊後大野市(大分県食肉検査所)、2019年1月30日
9. 森田幸雄、対米食肉輸出認定施設の衛生管理(大分県畜産公社むけ)、H30年度 輸出対策リーダー養成研修、大分県食肉検査所主催、大分県豊後大野市(大分県畜産公社)、2019年1月30日
10. 森田幸雄、と畜場等での内部検証と外部検証(微生物検査による検証)、H30年度HACCP平準化研修 九州ブロック、全国食肉衛生検査所協議会主催、佐賀県佐賀市(佐賀県庁)、2019年2月1日
11. 森田幸雄、STEC(腸管出血性大腸菌)の衛生管理、平成30年度 対米対香港輸出認定施設連絡協議会衛生講習会、対米対香港輸出認定施設連絡協議会主催、鹿児島県鹿児島市(ホテルレクストン鹿児島)、2019年2月2日
12. 森田幸雄、食鳥肉におけるカンピロバクター汚染のリスク管理について、平成30年度愛知県獣医公衆衛生関係研修会、愛知県健康福祉部保健医療局生活衛生課主催、愛知県名古屋市(愛知県庁)、2019年2月12日
13. 森田幸雄、と畜場におけるHACCP導入について、平成30年度 茨城県食の安全・安心意見交換会、茨城県県西食肉衛生検査所主催、茨城県筑西市(茨城県県西生涯学習センター)、2019年2月22日
14. 森田幸雄、食肉、食鳥およびジビエの衛生管理について、平成30年度 獣医公衆衛生講習会(九

州地区)、公益社団法人日本獣医師会主催(担当
獣医師会 (公社)福岡県獣医師会)、福岡市中
央区(福岡市健康づくりサポートセンター(あい
れふ))、2019年2月23日

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

表1 本研究で実施した食肉等処理施設の規模とHACCP導入状況

| 畜種 | 施設 | 規模（年間処理頭数） | | | HACCP導入状況 | |
|----|--------|------------|--------------|---------|-----------|----|
| | | <1500 | 1500－20000 | 20000< | 未 | 済み |
| 牛 | 東北1 | | ○ | | | ○ |
| | 関東1 | | ○ | | | ○ |
| | 中部1 | ○ | | | H31年度 | |
| | 中部2 | ○ | | | | ○ |
| | 中国・四国1 | | ○ | | | ○ |
| | 中国・四国2 | | ○ | | | ○ |
| | 中国・四国3 | ○ | | | | ○ |
| | 中国・四国4 | ○ | | | 未定 | |
| 畜種 | 施設 | 規模（年間処理頭数） | | | HACCP導入状況 | |
| | | <37500 | 37500－100000 | 100000< | 未 | 済み |
| 豚 | 東北1 | | | ○ | | ○ |
| | 東北2 | | ○ | | H30年度 | |
| | 関東1 | | ○ | | H31年度 | |
| | 関東2 | | ○ | | | ○ |
| | 中部1 | | ○ | | H31年度 | |
| | 中部2 | | ○ | | | ○ |
| | 中国・四国1 | | ○ | | | ○ |
| | 中国・四国2 | ○ | | | H30年度 | |
| | 中国・四国3 | | | ○ | | ○ |
| | 中国・四国4 | ○ | | | | ○ |
| 畜種 | 地域 | 規模（年間処理羽数） | | | HACCP導入状況 | |
| | | <7500000 | 7500000< | | 未 | 済み |
| 鶏 | 東北1 | | ○ | | | ○ |
| | 東北2 | | ○ | | | ○ |
| | 関東1 | ○ | | | | ○ |
| | 中部1 | ○ | | | | ○ |

| 表2 熟成肉の微生物学的検査成績 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|----|------------------|----------------|---------|---------|--------|-----|-----|------|-----|------------|-----|----------|-----|------|-----|-----------|-----|
| 検体 | 性別 | 月齢 (牛) 日齢 (豚) | 衛生指標細菌 (cfu/g) | | | | | | | | 病原細菌 (定性) | | | | | | | |
| | | | 一般細菌 | | 腸内細菌科菌群 | | 大腸菌 | | 大腸菌群 | | Salmonella | | Listeria | | STEC | | S. aureus | |
| | | | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 | 熟成前 | 熟成後 |
| 牛1 | メス | 151 | ud | 555.0 | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 牛2 | メス | 163 | ud | 2600.0 | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 牛3 | メス | 134 | ud | 845.0 | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 牛4 | メス | 172 | ud | 6050.0 | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 牛5 | メス | 154 | ud | 1400.0 | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 豚1 | メス | 181 | 280.0 | 12100.0 | ud | 520.0 | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 豚2 | メス | 181 | ud | 34500.0 | ud | 1165.0 | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 豚3 | メス | 181 | ud | 7450.0 | ud | 475.0 | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 豚4 | メス | 181 | ud | 690.0 | ud | 190.0 | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| 豚5 | メス | 181 | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | ud | — | — | — | — | — | — | |
| ud: 検出限界未満 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

表3 「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」試行成績（牛；施設別）

| 施設 | 採材週 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfu/cm ²) | | | |
|--------|-----|------------------------------|--------|--------|---------|---------------------------------|-----|------|------|
| | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最大値 | 最小値 | 平均値 | 中央値 |
| 東北1 | 1 | 10.0 | 150.0 | 67.7 | 51.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | ud | 90.0 | 19.8 | 4.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | ud | 455.0 | 163.5 | 55.5 | 2.7 | ud | 0.5 | ud |
| | 4 | 14.3 | 310.0 | 115.4 | 102.0 | 2.1 | ud | 0.4 | ud |
| | 5 | 3.0 | 10.8 | 6.6 | 5.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 455.0 | 74.6 | 14.3 | 2.7 | ud | 0.2 | ud |
| 関東1 | 1 | 21.3 | 146.5 | 64.9 | 33.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 11.3 | 157.5 | 97.7 | 122.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 3.0 | 124.5 | 51.8 | 9.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 14.0 | 61.0 | 29.9 | 22.7 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 84.0 | 685.0 | 249.0 | 126.0 | 1.5 | ud | 0.3 | ud |
| | 計 | 3.0 | 685.0 | 98.7 | 61.0 | 1.5 | ud | 0.1 | ud |
| 中部1 | 1 | 12.8 | 955.0 | 344.06 | 275.0 | 6.3 | ud | 3.5 | 5.0 |
| | 2 | 60.0 | 2907.5 | 1109.1 | 118.5 | 110.0 | ud | 22.8 | 1.7 |
| | 3 | 865.0 | 3100.0 | 1920.0 | 2035.0 | 2.4 | ud | 0.5 | ud |
| | 4 | 120.5 | 1655.0 | 665.7 | 590.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 65.0 | 1915.0 | 673.8 | 555.0 | 3.5 | ud | 1.4 | 1.6 |
| | 計 | 12.8 | 3100.0 | 942.5 | 590.0*1 | 110.0 | ud | 5.6 | ud*1 |
| 中部2 | 1 | 5.5 | 95.5 | 36.5 | 20.7 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | ud | 70.5 | 18.1 | 4.1 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 5.9 | 79.0 | 24.2 | 12.0 | 2.1 | ud | 0.4 | ud |
| | 4 | 3.5 | 800.0 | 186.3 | 14.1 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 8.2 | 69.5 | 28.1 | 10.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 800.0 | 58.6 | 12.1*2 | 2.1 | ud | 0.1 | ud |
| 中国・四国1 | 1 | 31.0 | 183.0 | 79.0 | 55.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 10.9 | 400.0 | 111.1 | 20.2 | ud | 1.6 | 0.3 | ud |
| | 3 | 16.0 | 5200.0 | 1063.5 | 33.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 21.1 | 179.5 | 76.0 | 60.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 37.5 | 1860.0 | 449.8 | 103.5 | ud | 1.9 | 0.4 | ud |
| | 計 | 10.9 | 5200.0 | 355.9 | 55.5 | ud | 1.9 | 0.1 | ud |
| 中国・四国2 | 1 | 5.3 | 140.0 | 47.7 | 11 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 15.0 | 67.0 | 28.6 | 20 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 29.0 | 65.0 | 48.0 | 55 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 16.0 | 120.0 | 42.8 | 25 | ud | ud | ud | ud |
| | 5*3 | 29.0 | 1500.0 | 409.3 | 224 | ud | 3.6 | 0.7 | 0.15 |
| | 計 | 5.3 | 1500.0 | 126.6 | 30 | ud | 3.6 | 0.2 | ud |

表3 つづき

| | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|----|
| 中国・四国 ³ | 1 | ud | 57.0 | 15.4 | 4.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | ud | 720.0 | 147.2 | 4.2 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | ud | 7.1 | 3.1 | 3.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 5.0 | 110.0 | 30.0 | 9.2 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 ^{*4} | ud | 830.0 | 279.5 | 8.6 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 830.0 | 79.0 | 5.0 | ud | ud | ud | ud |
| 中国・四国 ^{4*5} | 1 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 38.0 | 49.0 | 43.5 | 43.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 190.0 | 190.0 | 190.0 | 190.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | 25.0 | 190.0 | 75.5 | 43.5 | ud | ud | ud | ud |

ud: 検出限界未満

| 表4 HACCP 導入状況別、年間処理頭数別、およびHACCP 導入状況/年間処理頭数別の一般細菌数、および腸内細菌科菌群数 (牛) | | | | | | | | | | |
|--|--------------|-----|------------------------------|------|--------|-------|---------------------------------|-----|-------|-----|
| 施設条件 | 施設数 | 検体数 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfu/cm ²) | | | |
| | | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 |
| HACCP 導入済 | 未導入 | 2 | 29 | 12.8 | 3100.0 | 822.9 | 375.0*1 | ud | 110.0 | 4.8 |
| | 導入済 | 6 | 149 | ud | 5200.0 | 132.9 | 25.0*1 | ud | 3.6 | 0.1 |
| 年間 処理頭数 | < 1,500 | 4 | 77 | ud | 3100.0 | 352.6 | 38 | ud | 110.0 | 1.9 |
| | 1,500-20,000 | 4 | 101 | ud | 5200.0 | 163.6 | 51.0 | ud | 3.6 | 0.1 |
| HACCP 未導入 | < 1,500 | 2 | 29 | 12.8 | 3100.0 | 822.9 | 375.0*3 | ud | 110.0 | 4.8 |
| HACCP 導入済 | < 1,500 | 2 | 48 | ud | 830.0 | 68.4 | 8.9*3*5 | ud | 2.1 | 0.0 |
| | 1,500-20,000 | 4 | 101 | ud | 5200.0 | 163.6 | 51.0*5 | ud | 3.6 | 0.1 |

*1, *2, *3, *4, *5: p < 0.01 (赤字: 他より多い、青字: 他より少ない)

表5 「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」試行成績（豚；施設別）

| 施設 | 採材週 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfy/cm ²) | | | |
|-----|-----|------------------------------|--------|--------|---------|---------------------------------|------|------|-------|
| | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 |
| 東北1 | 1 | ud | 30.4 | 11.2 | 9.6 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 5.2 | 49.0 | 24.5 | 17.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 2.5 | 12.3 | 6.9 | 7.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 4.1 | 189.0 | 47.2 | 6.1 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 3.8 | 11.6 | 8.4 | 9.7 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 189.0 | 19.6 | 9.6*1 | ud | ud | ud | ud |
| 東北2 | 1 | 7.3 | 28.5 | 14.3 | 10.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 24.6 | 266.8 | 108.1 | 75.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 9.3 | 35.0 | 20.1 | 14.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | ud | 4.0 | 1.6 | ud | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 18.7 | 80.5 | 48.8 | 58.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 266.8 | 38.6 | 18.7 | ud | ud | ud | ud |
| 関東1 | 1 | 78.5 | 505.0 | 218.8 | 139.0 | 1.8 | 68.5 | 30.3 | 32.0 |
| | 2 | 270.0 | 1865.0 | 907.0 | 700.0 | 3.3 | 87.5 | 38.8 | 40.0 |
| | 3 | 16.6 | 248.0 | 144.9 | 150.0 | ud | 3.3 | 1.0 | ud |
| | 4 | 205.5 | 2500< | 1249.1 | 700.0 | 1.7 | 6.1 | 3.0 | 2.5 |
| | 5 | 12.2 | 107.0 | 59.0 | 57.5 | ud | 2.0 | 0.4 | ud |
| | 計 | 12.2 | 2500< | 515.8 | 207.0*1 | ud | 87.5 | 14.7 | 2.5*1 |
| 関東2 | 1 | 20.2 | 118.5 | 66.9 | 61.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 46.0 | 157.5 | 104.6 | 122.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | ud | 25.8 | 12.3 | 7.0 | ud | 1.5 | 0.3 | ud |
| | 4 | 8.2 | 23.4 | 19.6 | 22.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 35.0 | 430.0 | 202.7 | 106.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 430.0 | 81.2 | 46.0 | ud | 1.5 | 0.1 | ud |
| 中部1 | 1 | 56.5 | 179.5 | 108.4 | 73.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 12.4 | 50.5 | 22.5 | 16.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 20.2 | 300.0 | 109.9 | 70.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 8.8 | 1810.0 | 384.6 | 22.1 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 4.9 | 34.5 | 19.4 | 20.2 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | 4.9 | 1810.0 | 129.0 | 34.5 | ud | ud | ud | ud |
| 中部2 | 1 | 4.1 | 50.0 | 21.6 | 23.9 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | ud | 60.5 | 19.1 | 13.2 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 12.6 | 54.5 | 32.5 | 30.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | ud | 6.4 | 2.8 | 2.6 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 2.8 | 248.0 | 68.9 | 41.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 248.0 | 29.0 | 13.2*2 | ud | ud | ud | ud |

表5 つづき

| 施設 | 採材週 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfu/cm ²) | | | |
|----------------------|-----|------------------------------|--------|--------|---------------------|---------------------------------|------|------|------|
| | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 |
| 中国・四国1 | 1 | 14.7 | 180.5 | 57.4 | 31.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 45.5 | 385.0 | 194.7 | 218.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 53.5 | 5900.0 | 1307.1 | 129.5 | ud | 2.3 | 0.5 | ud |
| | 4 | 133.0 | 2850.0 | 874.8 | 490.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 4.2 | 32.0 | 17.3 | 16.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | 4.2 | 5900.0 | 490.3 | 101.0* ¹ | ud | 2.3 | 0.1 | ud |
| 中国・四国2 | 1 | 9.0 | 170.0 | 77.4 | 44.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 2.8 | 8.8 | 6.5 | 7.5 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 7.1 | 54.0 | 23.8 | 20.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 3.1 | 36.0 | 11.5 | 6.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 3.9 | 23.0 | 11.2 | 11.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | 2.8 | 170.0 | 26.1 | 9.0* ² | ud | ud | ud | ud |
| 中国・四国3* ³ | 1 | 16.0 | 150.0 | 55.8 | 26.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 21.0 | 240.0 | 106.0 | 88.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 8.4 | 260.0 | 71.5 | 29.0 | ud | 7.8 | 2.0 | ud |
| | 4 | 11.0 | 330.0 | 149.0 | 110.0 | ud | 27.0 | 13.1 | 13.0 |
| | 5 | 2.6 | 9.2 | 4.8 | 3.8 | ud | 0.0 | 0.0 | ud |
| | 6 | 1.1 | 23.0 | 8.7 | 7.1 | ud | 2.3 | 0.5 | ud |
| | 計 | 1.1 | 330.0 | 68.1 | 24.0 | ud | 27.0 | 2.7 | ud |
| 中国・四国4 | 1 | ud | 4.7 | 2.4 | 3.3 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 9.0 | 98.0 | 47.6 | 29.0 | ud | ud | ud | ud |
| | 3 | 13.0 | 75.0 | 48.0 | 58.0 | ud | 4.4 | 0.9 | ud |
| | 4 | ud | 28.0 | 12.0 | 9.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | ud | 38.0 | 8.9 | 2.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 98.0 | 23.8 | 9.2* ¹ | ud | 4.4 | 0.2 | ud |

ud: 検出限界未満

*1: p<0.01, *2: p<0.05 (赤字: 他施設より多い、青字: 他施設より少ない)

*3: 6回実施分のデータ

| 表6 HACCP導入状況別、年間処理頭数別、およびHACCP導入状況/年間処理頭数別の一般細菌数、および腸内細菌科菌群数 (豚) | | | | | | | | | | |
|--|----------------|-----|------------------------------|-----|--------|-------|---------------------------------|-----|------|-----|
| 施設条件 | 施設数 | 検体数 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfu/cm ²) | | | |
| | | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 |
| HACCP | 未導入 | 4 | 100 | ud | 5900.0 | 178.3 | 22.5*1 | ud | 87.5 | 2.1 |
| | 導入済 | 6 | 154 | ud | 5900.0 | 143.2 | 27.5*1 | ud | 87.5 | 1.8 |
| 規模 | < 37,500 | 2 | 50 | 0.3 | 170.0 | 27.1 | 9.2*2 | ud | 4.4 | 0.1 |
| | 37,500-100,000 | 6 | 150 | ud | 5900.0 | 214.0 | 44.3*2,3 | ud | 87.5 | 2.5 |
| | 100,000< | 2 | 54 | ud | 330.0 | 45.6 | 11.9*3 | ud | 27 | 1.4 |
| HACCP | < 37,500 | 1 | 25 | 2.8 | 170.0 | 26.1 | 9.0*6 | ud | ud | 0.0 |
| 未導入 | 37,500-100,000 | 3 | 75 | ud | 5900.0 | 203.7 | 56.5*6 | ud | 87.5 | 2.5 |
| HACCP 導入済 | < 37,500 | 1 | 25 | 0.3 | 98.0 | 28.3 | 9.2*7 | ud | 4.4 | 0.2 |
| | 37,500-100,000 | 3 | 75 | ud | 5900.0 | 131.3 | 35.0*7,8 | ud | 2.3 | 0.0 |
| | 100,000< | 2 | 54 | ud | 330.0 | 45.6 | 11.9*8 | ud | 27 | 1.4 |

ud: 検出限界未満

*1, 4, 5, 9: $p < 0.05$, *2, 3, 6, 7, 8: $p < 0.01$, (赤字: 他より多い、青字: 他より少ない)

表7 「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」 試行成績（鶏；施設別）

| 施設 | 採材週 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfu/cm ²) | | | |
|-------|-----|------------------------------|--------|-------|--------|---------------------------------|-------|-------|-------|
| | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 |
| 東北1 | 1 | ud | 690.0 | 146.3 | 14.4 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | ud | 168.0 | 57.1 | 22 | ud | 28.0 | 9.3 | ud |
| | 3 | ud | 49.4 | 14.8 | ud | ud | 11.4 | 2.3 | ud |
| | 4 | ud | 15.4 | 3.1 | ud | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | ud | 12.4 | 4.6 | ud | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 690.0 | 45.2 | ud*1 | ud | 28 | 2.3 | ud |
| 東北2*2 | 1 | ud | 24.4 | 13.5 | 13.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | ud | 12.0 | 2.4 | ud | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 24.4 | 7.9 | 6.0*1 | ud | ud | ud | ud |
| 関東1 | 1 | 30.0 | 118.7 | 65.2 | 59.6 | ud | 10.0 | 3.7 | ud |
| | 2 | 39.0 | 410.0 | 176.4 | 116.6 | 8.2 | 60.5 | 25.1 | 9.6 |
| | 3 | 41.2 | 1081.0 | 295.6 | 52.8 | ud | 24.8 | 5.0 | ud |
| | 4 | 39.0 | 3400.0 | 905.2 | 99.1 | 7.6 | 330.0 | 75.7 | 9.4 |
| | 5 | 32.0 | 710.0 | 240.4 | 162.0 | ud | 506.0 | 126.4 | 14.6 |
| | 計 | 30.0 | 3400.0 | 336.6 | 79.9*1 | ud | 506 | 47.2 | 8.4*1 |
| 中部1 | 1 | 18.6 | 35.0 | 28.1 | 30.2 | ud | ud | ud | ud |
| | 2 | 23.2 | 106.8 | 59.7 | 46.8 | ud | 29.6 | ud | ud |
| | 3 | ud | 716.0 | 194.3 | 41.2 | ud | ud | ud | ud |
| | 4 | 47.6 | 172.0 | 95.8 | 72.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 5 | 20.0 | 326.0 | 100.6 | 35.8 | ud | ud | ud | ud |
| | 計 | ud | 716.0 | 95.7 | 41.2 | ud | 29.6 | 1.2 | ud |

ud: 検出限界未満

*1: $p < 0.01$ （赤字：他施設より多い、青字：他施設より少ない）

*2: 2回実施分のデータ

| 表8 年間処理羽数別の一般細菌数、および腸内細菌科菌群数（鶏） | | | | | | | | | | |
|--|-------------|-----|------------------------------|------|--------|-------|---------------------------------|-----|-------|------|
| 施設条件*1 | 施設数 | 検体数 | 一般細菌数 (cfu/cm ²) | | | | 腸内細菌科菌群数 (cfu/cm ²) | | | |
| | | | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | 平均値 | 中央値 |
| 規模 | < 7,500,000 | 2 | 50 | 18.6 | 3400.0 | 216.1 | 51.5*2 | ud | 506.0 | 24.2 |
| | 7,500,000< | 2 | 35 | ud | 690.0 | 34.5 | ud*2 | ud | 28.0 | 1.7 |
| ud: 検出限界未満 | | | | | | | | | | |
| *1: 全ての施設でHACCP導入済み | | | | | | | | | | |
| *2, 3: $p < 0.01$ (赤字: 他より多い、青字: 他より少ない) | | | | | | | | | | |

表9 検体採取法（拭取法と切除法）別にみた衛生指標細菌数の比較（牛）

| 牛枝肉# | 採材法 | 検体番号 | 筋肉 (cfu/cm ²) | | | | 検体番号 | 脂肪 (cfu/cm ²) | | | |
|------|-----|------|---------------------------|------|-----|------|------|---------------------------|-------|-----|------|
| | | | 一般細菌 | 腸内*1 | 大腸菌 | 大腸菌群 | | 一般細菌 | 腸内*1 | 大腸菌 | 大腸菌群 |
| 1 | 拭取 | A赤F1 | 438.0 | ud | ud | ud | A白F1 | 216.0 | ud | ud | ud |
| | | A赤F2 | 2080.0 | ud | ud | ud | A白F2 | 350.0 | ud | ud | ud |
| | | A赤F3 | 716.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | 切除 | A赤H1 | 830.7 | ud | ud | ud | A白H1 | 8748.0 | ud | ud | ud |
| | | A赤H2 | 1944 | ud | ud | ud | A白H2 | 1494.0 | ud | ud | ud |
| | | A赤H3 | 919.8 | ud | ud | ud | | | | | |
| 2 | 拭取 | B赤F1 | 1240.0 | ud | ud | ud | B白F1 | 39.0 | ud | ud | ud |
| | | B赤F2 | 81.0 | ud | ud | ud | B白F2 | 41.0 | ud | ud | ud |
| | | B赤F3 | 58.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | 切除 | B赤H1 | 462.6 | ud | ud | ud | B白H1 | 9774.0 | ud | ud | ud |
| | | B赤H2 | 3438.0 | 54.0 | ud | ud | B白H2 | 13140.0 | ud | ud | ud |
| | | B赤H3 | 3258.0 | ud | ud | | | | | | |
| 3 | 拭取 | F1 | ud | ud | ud | ud | 検討せず | | | | |
| | | F2 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | | F3 | 21.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | 切除 | イH1 | 162.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | イH2 | 137.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | イH3 | 37440.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| 4 | 拭取 | F4 | 38.0 | ud | ud | ud | 検討せず | | | | |
| | | F5 | 48.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | F6 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | 切除 | ロH4 | 360.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | ロH5 | 410.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | ロH6 | 284.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| 5 | 拭取 | F7 | 109.0 | ud | ud | ud | 検討せず | | | | |
| | | F8 | 1320.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | F9 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | 切除 | ハH7 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | | ハH8 | 4734.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| | | ハH9 | 821.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| 6 | 拭取 | F10 | ud | ud | ud | ud | 検討せず | | | | |
| | | F11 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | | F12 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | 切除 | ニH10 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | | ニH11 | ud | ud | ud | ud | | | | | |
| | | ニH12 | 1980.0 | ud | ud | ud | | | | | |
| 7 | 拭取 | 検討せず | | | | | FA | 1000.0< | ud | ud | ud |
| | | | | | | | FB | 724.0 | ud | ud | ud |
| | 切除 | | | | | | ホHG | ud | ud | ud | ud |
| | | | | | | | ホHH | 3834.0 | ud | ud | ud |
| 8 | 拭取 | 検討せず | | | | | FC | 1000.0< | ud | ud | ud |
| | | | | | | | FD | 39.0 | ud | ud | ud |
| | 切除 | | | | | | ヘHE | ud | ud | ud | ud |
| | | | | | | | ヘHF | 1044.0 | 144.0 | ud | ud |
| 9 | 拭取 | 検討せず | | | | | FE | 124.0 | ud | ud | ud |
| | | | | | | | FF | 168.0 | ud | ud | ud |
| | 切除 | | | | | | トHC | 90000.0 | ud | ud | ud |
| | | | | | | | トHD | 90000.0 | ud | ud | ud |
| 10 | 拭取 | 検討せず | | | | | FG | ud | ud | ud | ud |
| | | | | | | | FH | 18.0 | ud | ud | ud |
| | 切除 | | | | | | チHA | ud | ud | ud | ud |
| | | | | | | | チHB | ud | ud | ud | ud |

ud：検出限界未満

*1：腸内；腸内細菌科菌群

表10 検体採取法（拭取法と切除法）別にみた衛生指標細菌数の比較（豚）

| 豚枝肉 # | 採材法 | 検体番号 | 脂肪 (cfu/cm ²) | | | |
|-------|-----|------|---------------------------|--------|-----|--------|
| | | | 一般細菌 | 腸内*1 | 大腸菌 | 大腸菌群 |
| 1 | 拭取 | F1 | 362.0 | ud | ud | ud |
| | | F2 | 220.0 | ud | ud | ud |
| | | F3 | 2400.0 | ud | ud | ud |
| | | F4 | 1137.0 | ud | ud | ud |
| | | F5 | 1306.0 | ud | ud | ud |
| | | F6 | 1940.0 | ud | ud | ud |
| | | F7 | 968.0 | ud | ud | ud |
| | | F8 | 1300.0 | ud | ud | ud |
| | | F9 | 508.0 | ud | ud | ud |
| | | F10 | 444.0 | ud | ud | ud |
| | | 中央値 | 1052.5*2 | ud | ud | ud |
| | 切除 | H1 | 2016.0 | ud | ud | ud |
| | | H2 | 18540.0 | 1548.0 | ud | 1044.0 |
| | | H3 | 3834.0 | ud | ud | ud |
| | | H4 | 5022.0 | ud | ud | ud |
| | | H5 | 6174.0 | ud | ud | ud |
| | | H6 | 5706.0 | ud | ud | ud |
| | | H7 | 4446.0 | ud | ud | ud |
| | | H8 | 19080.0 | ud | ud | ud |
| | | H9 | 3708.0 | ud | ud | ud |
| | | H10 | 1980.0 | ud | ud | ud |
| | | 中央値 | 4734.0*2 | ud | ud | ud |
| 2 | 拭取 | F1 | 104.5 | ud | ud | ud |
| | | F2 | 30.0 | ud | ud | ud |
| | | F3 | ud | ud | ud | ud |
| | | F4 | ud | ud | ud | ud |
| | | F5 | ud | ud | ud | ud |
| | | F6 | ud | ud | ud | ud |
| | | F7 | ud | ud | ud | ud |
| | | F8 | ud | ud | ud | ud |
| | | F9 | 69.5 | ud | ud | ud |
| | | F10 | 520.0 | ud | ud | ud |
| | | 中央値 | ud | ud | ud | ud |

表10 つづき

| 豚枝肉 # | 採材法 | 検体番号 | 脂肪 (cfu/cm ²) | | | |
|-------|-----|------|---------------------------|------|-----|------|
| | | | 一般細菌 | 腸内*1 | 大腸菌 | 大腸菌群 |
| 2 | 切除 | H1 | 78.5 | ud | ud | ud |
| | | H2 | 81.5 | ud | ud | ud |
| | | H3 | ud | ud | ud | ud |
| | | H4 | 46.5 | ud | ud | ud |
| | | H5 | 74.0 | ud | ud | ud |
| | | H6 | ud | ud | ud | ud |
| | | H7 | ud | ud | ud | ud |
| | | H8 | 26.0 | ud | ud | ud |
| | | H9 | 25.0 | ud | ud | ud |
| | | H10 | 55.0 | ud | ud | ud |
| | | 中央値 | 36.3 | ud | ud | ud |
| 3 | 拭取 | F1 | 167.5 | ud | ud | ud |
| | | F2 | 111.0 | ud | ud | ud |
| | | F3 | 28.5 | ud | ud | ud |
| | | F4 | 26.0 | ud | ud | ud |
| | | F5 | ud | ud | ud | ud |
| | | F6 | ud | ud | ud | ud |
| | | F7 | 26.5 | ud | ud | ud |
| | | F8 | ud | ud | ud | ud |
| | | F9 | ud | ud | ud | ud |
| | | F10 | ud | ud | ud | ud |
| | | 中央値 | 13.0*3 | ud | ud | ud |
| | 切除 | H1 | 39.0 | ud | ud | ud |
| | | H2 | 150.5 | ud | ud | ud |
| | | H3 | 73.0 | ud | ud | ud |
| | | H4 | ud | ud | ud | ud |
| | | H5 | 52.0 | ud | ud | ud |
| | | H6 | 136.0 | ud | ud | ud |
| | | H7 | 238.3 | ud | ud | ud |
| | | H8 | 86.5 | ud | ud | ud |
| | | H9 | 84.5 | ud | ud | ud |
| | | H10 | 212.8 | ud | ud | ud |
| | | 中央値 | 85.5*3 | ud | ud | ud |

ud: 検出限界未満

*1: 腸内 ; 腸内細菌科菌群

*2, : $p < 0.01$, *3: $p < 0.05$ (赤字 : 他より多い、青字 : 他より少ない)

表11 検体採取法（拭取法と切除法）別にみた衛生指標細菌数の比較（鶏）

| 採材法 | 検体番号 | 胸部 (cfu/cm ²) | | | | 検体番号 | モモ (cfu/cm ²) | | | |
|-----|------|---------------------------|--------|------|--------|------|---------------------------|--------|------|--------|
| | | 一般細菌 | 腸内*1 | 大腸菌 | 大腸菌群 | | 一般細菌 | 腸内*1 | 大腸菌 | 大腸菌群 |
| 拭取 | F1 | 43.6 | 0.6 | ud | ud | F2 | 28.6 | 1.0 | ud | ud |
| | F3 | 40.8 | 1.0 | ud | 0.4 | F4 | 226.0 | 1.4 | ud | 1.2 |
| | F5 | 16.2 | ud | ud | ud | F6 | 40.4 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| | F7 | 45.8 | 0.4 | ud | ud | F8 | 132.0 | 1.6 | 0.2 | 0.4 |
| | F9 | 244.0 | 3.2 | 0.4 | 0.8 | F10 | 98.0 | 0.6 | ud | 0.6 |
| | 中央値 | 43.6*2 | 0.6*3 | ud | ud*4 | 中央値 | 98.0*5 | 1.0*6 | ud | 0.4*7 |
| 切除 | K1 | 1134.8 | 52.3 | ud | 22.1 | K2 | 1019.0 | 51.9 | 6.0 | 18.0 |
| | K3 | 3108.1 | 37.5 | 6.3 | 22.9 | K4 | 1812.0 | 38.7 | 4.1 | 24.4 |
| | K5 | 1810.3 | 26.4 | 24.4 | 61.0 | K6 | 1118.7 | 12.2 | ud | 4.1 |
| | K7 | 990.4 | 26.9 | ud | 6.2 | K8 | 2007.0 | 108.5 | 26.6 | 81.9 |
| | K9 | 2093.0 | 65.7 | 4.1 | 65.7 | K10 | 1854.6 | 18.3 | ud | 18.3 |
| | 中央値 | 1810.3*2 | 37.5*3 | 4.1 | 22.9*4 | 中央値 | 1812.0*5 | 38.7*6 | 4.1 | 18.3*7 |

ud: 検出限界未満

*1: 腸内；腸内細菌科菌群

*2, 3, 4, 5, 6, 7: $p < 0.05$ （赤字：他より多い、青字：他より少ない）



図 1 微生物検査による HACCP の内部検証と外部検証



図 2 5 cm×5 cm のステンレス板

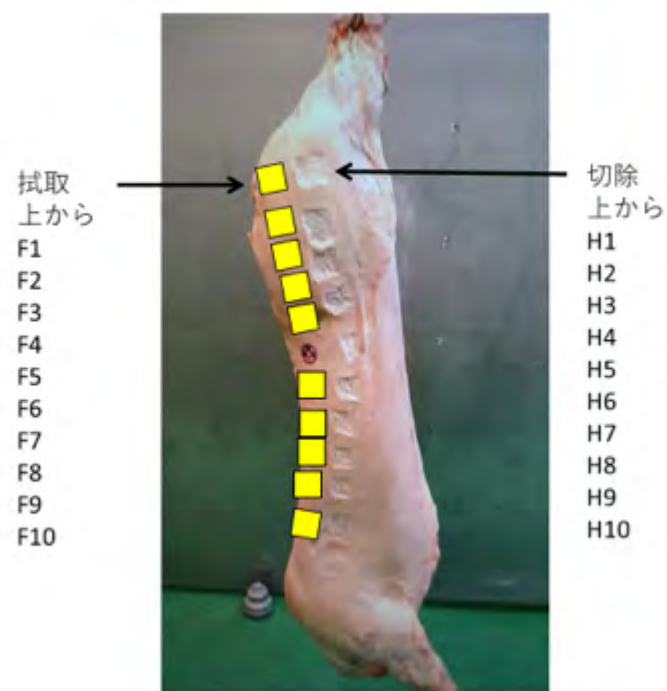


図5 1回目 豚枝肉の拭取、切除部位

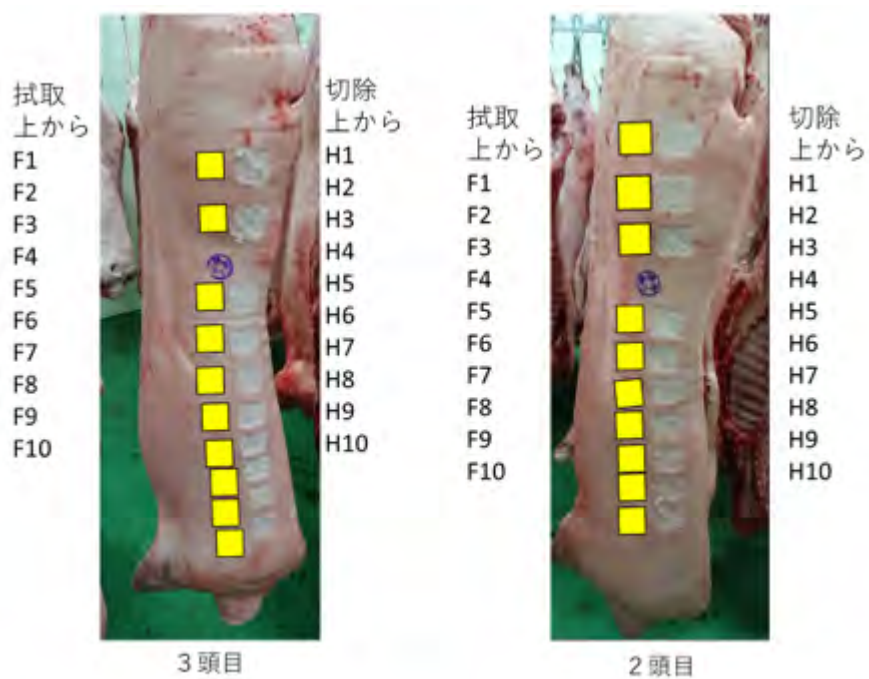


図6 2回目 豚枝肉の拭取、切除部位

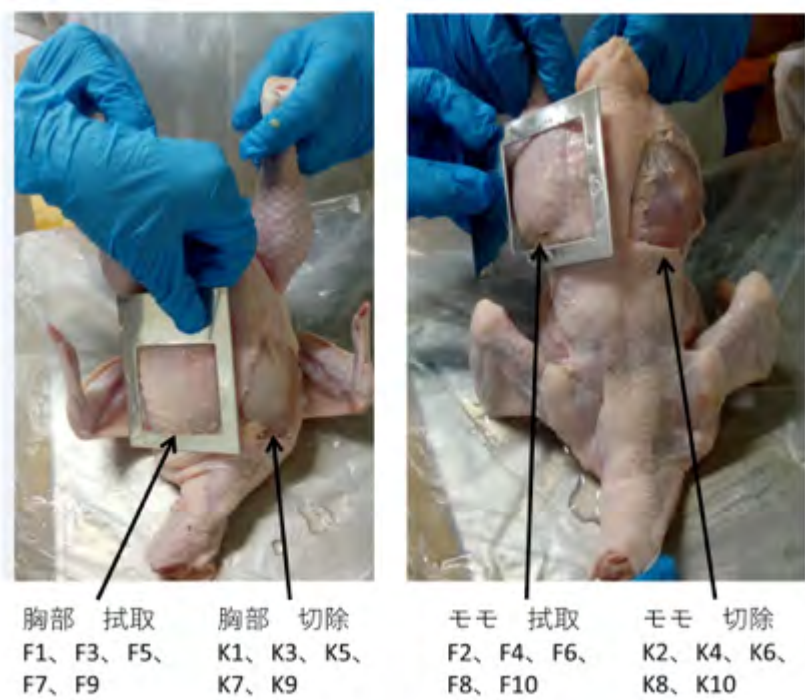


図7 鶏中抜きと体の胸部、モモの拭取、切除部位

スライド 1

牛の検体採取部位(切除法又はスポンジ法)

- ・ 大腸菌検査(施設)及びサルモネラ検査(行政)
- ・ とさつ、解体、冷蔵庫に搬入後12時間以上経過し、無作為に抽出した枝肉
- ・ 【大腸菌】300頭につき1検体、又は週に1検体
- ・ 【サルモネラ】連続82検体/週

牛の採材部位
肛門周囲、ともばら、胸部(10cm×10cm)を採取。

Guidelines for *Escherichia coli* testing for Process Control
Verification in Cattle and Swine Slaughter Establishments

スライド 2

豚の検体採取部位(切除法又はスポンジ法)

- ・ 大腸菌検査(施設)及びサルモネラ検査(行政)
- ・ とさつ、解体、冷蔵庫に搬入後12時間以上経過し、無作為に抽出した枝肉
- ・ 【大腸菌】1,000頭につき1検体、又は週に1検体
- ・ 【サルモネラ】連続82検体/週

豚の採材部位
肛門周囲、胸部、頸部(10cm×10cm)を採取。

Guidelines for *Escherichia coli* testing for Process Control
Verification in Cattle and Swine Slaughter Establishments

図 8 HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会資料

スライド 3

鶏の検体採取方法(リンスパック法)

- ・大腸菌等を用いた指標菌検査(施設)及びサルモネラ及びカンピロバクター検査(行政)
- ・チラー冷却後、無作為に抽出し、水分を十分に除去した中抜きと体
- ・【指標菌】22000羽につき1検体、又は週に1検体
- ・【サルモネラ・カンピロバクター】連続51検体/週

FSIS Directive 10250.1



FSIS検査におけるサンプリング方法

チラー後のと体で水分を除去したところで、無作為に抽出した中抜きと体を用いる。
中抜きと体1羽を大きな滅菌ビニール袋に入れた後に、バターフィールドの滅菌緩衝液400mlを入れ、シェイクする。

※ 指標菌のサンプリング方法は施設が決定する。

スライド 4

米国:検査結果の評価:牛/豚の大腸菌検査(切除法) 施設が実施:内部検証

- ア 直近の検体数(n)13検体中の結果で判断。
イ 合格判定値(m)以下の場合合格。
ウ mから条件付き合格判定値(M)までの条件付き合格範囲(m~M)の検体数(c)が3検体までの場合は合格。
エ m~Mの値を示す検体数が4検体以上の場合、不合格となる。
オ M以上の値を示す検体が1検体以上の場合、不合格。

表 大腸菌検査結果の評価(牛、豚)

| 動物種 | 合格判定値 (m) | 条件付き合格判定値 (M) | 検体数 (n) | 条件付き合格範囲 の検体数(c) |
|----------|-----------------------|---------------------------|------------|---------------------|
| 去勢牛/未経産牛 | 陰性(注) | 100cfu/cm ² | 13 | 3 |
| 経産牛/雄牛 | 陰性(注) | 100cfu/cm ² | 13 | 3 |
| 豚 | 10cfu/cm ² | 10,000cfu/cm ² | 13 | 3 |

(注) 陰性:検出限界値 5cfu/cm² 以下

Guidelines for *Escherichia coli* Testing for Process Control Verification in Cattle and Swine Slaughter Establishments

図 8 つづき HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会資料

スライド5

米国: 検査結果の評価: 牛/豚の大腸菌検査(スポンジ法)

- ア 過去1年間の当該施設における検査結果の標準偏差(S.D.)を算出し、基準値(平均値 \pm 2S.D.又は平均値 \pm 3S.D.)を設定し、検査結果の評価を行うこと。
- イ 基準値の設定にあたっては、1 cm²当たりの菌数(不検出の場合は検出限界値)を用いること。

基準値を超える成績出た場合は不合格。

Guidelines for *Escherichia coli* Testing for Process Control Verification in Cattle and Swine Slaughter Establishments

スライド6

EUの微生物学的HACCP検証手法のまとめ

- ・ EU規則(EC2073/2006)により、HACCP検証のための施設による微生物検査(一般生菌数、腸内細菌科菌群数、サルモネラ属菌)を実施。
- ・ 牛及び豚については、とさつ、解体後、冷却前の枝肉(4カ所から計100cm²採取)、鶏については、冷却後の食鳥と体(3体の頸皮から計25g)から検体採取。
- ・ 何れの検査についても、検査結果が不適合の場合は、とさつ、解体方法の再点検、農場、生体動物のバイオセキュリティの再点検等を実施する。

| 注: 切除法検体の値 | | | | | サルモネラ (牛及び豚枝肉、鶏と体) | |
|-------------------------|-----|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------|
| 一般生菌数及び腸内細菌科菌群 (牛及び豚枝肉) | | | | | 検体数 | 最大許容数 |
| 検査項目 | 動物種 | 数値レベル (mL未満) | 許容レベル (mLから5mLの間) | 不適合レベル (10mL以上) | | |
| 一般生菌数 | 牛 | 3.5 log cfu/cm ² | 3.5 ~ 5.0 log cfu/cm ² | 5.0 log cfu/cm ² | 牛 | 50 2 |
| | 豚 | 4.0 log cfu/cm ² | 4.0 ~ 5.0 log cfu/cm ² | 5.0 log cfu/cm ² | 豚 | 50 3 5 |
| 腸内細菌科菌群数 | 牛 | 1.5 log cfu/cm ² | 1.5 ~ 2.5 log cfu/cm ² | 2.5 log cfu/cm ² | 鶏 | 50 5 7 |
| | 豚 | 2.0 log cfu/cm ² | 2.0 ~ 3.0 log cfu/cm ² | 3.0 log cfu/cm ² | | |

Regulation (EC) No 2073/2006 (食品衛生基準)

食品衛生基準 Meat Industry Guide Chapter 13 Microbiological Criteria

UK EU

図8 つづき HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会資料

スライド7



スライド8

牛「拭き取り検体」と「切除検体」の細菌数

拭き取り検体 cfu/cm²

切除検体 cfu/cm²

| | サンプルID | 一般細菌数 | 腸内細菌科菌数 | 大腸菌数 | E.coli | サンプルID | 一般細菌数 | 腸内細菌科菌数 | 大腸菌数 | E.coli |
|----|--------|--------|---------|------|--------|--------|----------|---------|------|--------|
| 筋肉 | F1 | 438.0 | ud | ud | ud | H1 | 8713.0 | ud | ud | ud |
| 筋肉 | F2 | 2080.0 | ud | ud | ud | H2 | 20822.4 | ud | ud | ud |
| 筋肉 | F3 | 716.0 | ud | ud | ud | H3 | 9231.7 | ud | ud | ud |
| 筋肉 | F4 | 216.0 | ud | ud | ud | H4 | 93798.0 | ud | ud | ud |
| 筋肉 | F5 | 350.0 | ud | ud | ud | H5 | 16218.2 | ud | ud | ud |
| 筋肉 | F6 | 1040.0 | ud | ud | ud | H6 | 5073.2 | ud | ud | ud |
| | 小計 | 609.5 | | | | | 15319.4 | | | |
| 脂肪 | F7 | 73.2 | ud | ud | ud | H7 | 35564.2 | 190 | ud | ud |
| 脂肪 | F8 | 57.8 | ud | ud | ud | H8 | 33629.8 | ud | ud | ud |
| 脂肪 | F9 | 39.0 | ud | ud | ud | H9 | 110409.5 | ud | ud | ud |
| 脂肪 | F10 | 41.2 | ud | ud | ud | H10 | 134758.0 | ud | ud | ud |
| | 小計 | 51.1 | | | | | 64949.3 | | | |
| | 対数平均 | 226.1 | | | | | 対数平均 | 32365.9 | | |

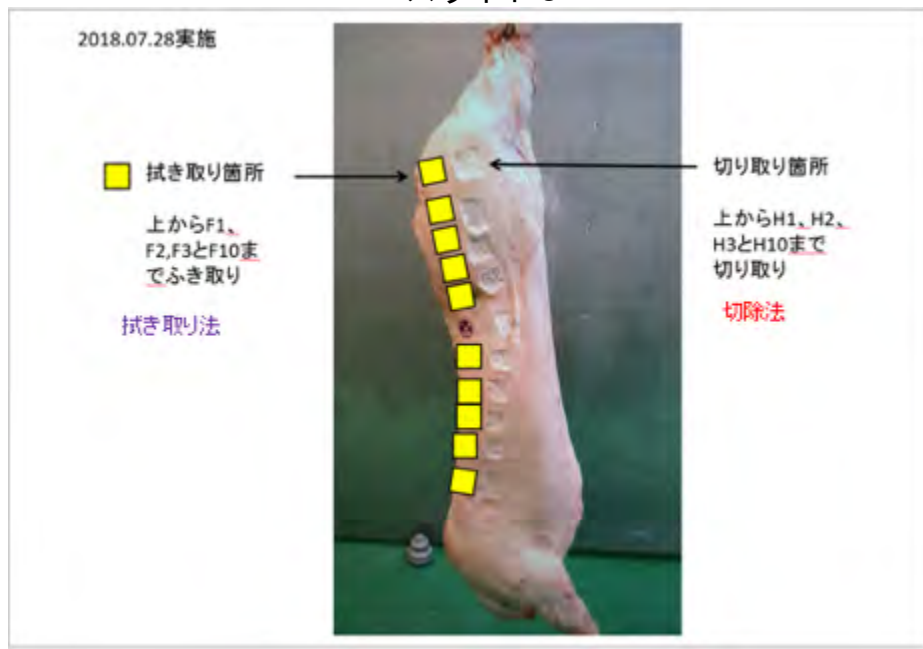
筋肉部:「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて 25倍 一般細菌数が多い

脂肪部:「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて1271倍 一般細菌数が多い 拭き取り法<切除法

全検体:「切除検体」は「拭き取り検体」と比べて143倍 一般細菌数が多い

図8 つづき HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会資料

スライド 9



スライド 10

豚「拭き取り検体」と「切除検体」の細菌数

| 拭き取り検体 cfu/cm ² | | | | | 切除検体 cfu/cm ² | | | | |
|----------------------------|-------|----------|------|----------------|--------------------------|---------|----------|------|----------------|
| サンプル ID | 一般生菌数 | 腸内細菌 科菌群 | 大腸菌群 | <i>E. coli</i> | サンプル ID | 一般生菌数 | 腸内細菌 科菌群 | 大腸菌群 | <i>E. coli</i> |
| F1 | 362 | ud | ud | ud | H1 | 22086.4 | ud | ud | ud |
| F2 | 220 | ud | ud | ud | H2 | 207648 | 430 | 430 | ud |
| F3 | 2400 | ud | ud | ud | H3 | 43111.2 | ud | ud | ud |
| F4 | 1137 | ud | ud | ud | H4 | 54126 | ud | ud | ud |
| F5 | 1306 | ud | ud | ud | H5 | 65856 | ud | ud | ud |
| F6 | 1940 | ud | ud | ud | H6 | 60990.8 | ud | ud | ud |
| F7 | 968 | ud | ud | ud | H7 | 47374.6 | ud | ud | ud |
| F8 | 1300 | ud | ud | ud | H8 | 202036 | ud | ud | ud |
| F9 | 508 | ud | ud | ud | H9 | 39387.2 | ud | ud | ud |
| F10 | 444 | ud | ud | ud | H10 | 21142 | ud | ud | ud |
| 対数平均 | 830.6 | | | | 対数平均 | 56686.3 | | | |

「切り取り検体」は「拭き取り検体」と比べて68倍 一般生菌数が多い

拭き取り法 < 切除法

図 8 つづき HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会資料

スライド 1 1



スライド 1 2

鶏「拭き取り検体」と「切除検体」の細菌数

| 拭き取り検体 cfu/cm ² | | | | | 切除検体 cfu/cm ² | | | | |
|----------------------------|-------|---------|------|----------------|--------------------------|--------|---------|------|----------------|
| サンプル ID | 一般生菌数 | 腸内細菌科菌群 | 大腸菌群 | <i>E. coli</i> | サンプル ID | 一般生菌数 | 腸内細菌科菌群 | 大腸菌群 | <i>E. coli</i> |
| 胸 F1 | 43.6 | 0.6 | ud | ud | 胸 H1 | 1134.8 | 52.3 | 22.1 | ud |
| モモ F2 | 26.6 | 1 | ud | ud | モモ H2 | 1019.0 | 51.9 | 18 | 6 |
| 胸 F3 | 40.8 | 1 | 0.4 | ud | 胸 H3 | 3108.1 | 37.5 | 22.9 | 6.3 |
| モモ F4 | 22.6 | 1.4 | 1.2 | ud | モモ H4 | 1812.0 | 38.7 | 24.4 | 4.1 |
| 胸 F5 | 16.2 | ud | ud | ud | 胸 H5 | 1810.3 | 26.4 | 61 | 24.4 |
| モモ F6 | 40.4 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | モモ H6 | 1118.7 | 12.2 | 4.1 | ud |
| 胸 F7 | 45.8 | 0.4 | ud | ud | 胸 H7 | 990.4 | 26.9 | 6.2 | ud |
| モモ F8 | 132 | 1.6 | 0.4 | 0.2 | モモ H8 | 2007.0 | 108.5 | 81.9 | 26.6 |
| 胸 F9 | 244 | 3.2 | 0.8 | 0.4 | 胸 H9 | 2093.0 | 65.7 | 65.7 | 4.1 |
| モモ F10 | 98 | 0.6 | 0.6 | ud | モモ H10 | 1854.6 | 18.3 | 18.3 | ud |
| 対数平均 | 63.6 | 0.8 | 0.5 | 0.3 | 対数平均 | 1587.7 | 36.7 | 22.5 | 6.6 |
| | | | | | | 25.0 | 43.8 | 43.9 | 34.2 |

一応、1つでもバトリファルムに出現している場合は計算をいたしました。
単純に対数平均値で比較すると、鶏の場合は

「拭き取り検体」は「拭き取り検体」と比べて25倍 一般生菌数が多い

拭き取り法 < 切除法

図 8 つづき HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会資料

III. 研 究 成 果 に 関 す る 刊 行 一 覧 表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
| 該当なし | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|-------------------|-------|-----------|------|
| 森田幸雄 | 腸管出血性大腸菌による食中毒の発生要因と発生予防のための検査 | 月刊 HACCP | 24 | 29-35 | 2018 |
| 壁谷英則 | と畜場への HACCP 導入の現状とこれからの課題 | モダンメディア | 64 | 71-18 | 2018 |
| *Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. | Retrograde Transport by Clathrin-Coated Vesicles is Involved in Intracellular Transport of PrPSc in Persistently Prion-Infected Cells. | Sci. Rep. | 8 (1) | 12241 | 2018 |
| Honda M, Sawaya M, Taira K, Yamazaki A, Kamata Y, Shimizu H, Kobayashi N, Sakata R, Asakura H, Sugita-Konishi Y | Effects of temperature, pH and curing on the viability of Sarcocystis, a Japanese sika deer (<i>Cervus Nippon centralis</i>) parasite, and the inactivation of their diarrheal toxin | J. Vet. Med. Sci. | 80 | 1337-1344 | 2018 |
| Miyazaki Y, Ishikawa T, Kamatari YO, Nakagaki T, Takatsuki H, Ishibashi D, Kuwata K, Nishida N, Atarashi R. | Identification of Alprenolol Hydrochloride as an Anti-prion Compound Using Surface Plasmon Resonance Imaging. | Mol. Neurobiol. | 56 | 367-377 | 2019 |
| Yamaguchi K, Kamatari YO, Ono F, Shibata H, Fuse T, Elhelaly AE, Fukuoka M, Kimura T, Hosokawa-Muto J, Ishikawa T, Tobiume M, Takeuchi Y, Matsuyama Y, Ishibashi D, Nishida N, Kuwata K. | A designer molecular chaperone against transmissible spongiform encephalopathy slows disease progression in mice and macaques. Nat Biomed Eng. 2019 Mar;3(3):206-219 | Nat. Biomed. Eng. | 3(3) | 206-219 | 2019 |
| *Sawada, K, Suzuki A, Yamasaki T, Iwamaru Y, Maatsuura Y, Miyazawa K, Masujin K, Atarashi | Estimation of prion infectivity in tissues of cattle infected with atypical BSE by real time-quaking induced conversion | J. Vet. Med. Sci. | 81 | In press | 2019 |

| | | | | | |
|----------------|--------|--|--|--|--|
| R, Horiuchi M. | assay. | | | | |
| | | | | | |

*代表的成果として、「IV. 研究成果の刊行物・別刷」の項に掲載した。

厚生労働大臣

殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠 原 正 典



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院獣医学研究院・教授
(氏名・フリガナ) 堀内 基広・ホリウチ モトヒロ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 有 無 | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|--|--|-------------------------------------|--------|--------------------------|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：動物の伝達性海綿状脳症の実験指針) | <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 | <input checked="" type="checkbox"/> | 北海道大学 | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣

殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠 原 正 典



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院獣医学研究院・助教
(氏名・フリガナ) 山崎 剛士・ヤマサキ タケシ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 有 無 | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|---|--|-------------------------------------|--------|--------------------------|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: 動物の伝達性海綿状脳症の実験指針) | <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 | <input checked="" type="checkbox"/> | 北海道大学 | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31年 2月 27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人宮崎大学

所属研究機関長 職 名 学 長

氏 名 池ノ上 克 印



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野・教授
(氏名・フリガナ) 新 竜一郎・アタラシ リュウイチロウ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年3月25日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 自治医科大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 永井 良三 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品を介する家畜・課金疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 先端医療技術開発センター共同利用コーディネート部門・講師
(氏名・フリガナ) 柴田 宏昭・シバタ ヒロアキ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 有 無 | 左記で該当がある場合のみ記入(※1) | | |
|-------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査(※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆平



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 細胞化学部 ・ 室長
(氏名・フリガナ) 萩原 健一 ・ ハギワラ ケンイチ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--------|---|---------------------|----------|----------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | | ■ | | | |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | | ■ | | | |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | | ■ | | | |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | ■ | | ■ | 国立感染症研究所 | |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | | ■ | | | |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|----------|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 ■ 未受講 |
|-------------|----------|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|----------------------|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 ■ 無 (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 ■ 無 (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 ■ 無 (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 無 ■ (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 感染病理部・主任研究官
- (氏名・フリガナ) 飛梅 実・ トビウメ ミノル

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 有 無 | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--|--------------------------|--------|--------------------------|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



平成31年3月25日

厚生労働大臣 殿

機関名 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

所属研究機関長 職 名 部門長

氏 名 小倉 弘明



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) ウイルス・疫学研究領域牛ウイルスユニット・主任研究員

(兼) 越境性感染症研究領域プリオン病ユニット

(氏名・フリガナ) 松浦 裕一 (マツウラ ユウイチ)

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 農研機構動物衛生研究部門 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

地方独立行政法人
機関名 北海道立総合研究機構
所属研究機関長 職名 理事長
氏名 田中 義克



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 畜産試験場 基盤研究部 家畜衛生グループ 主査
(氏名・フリガナ) 福田 茂夫 (フクダ シゲオ)

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:道総研におけるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程) | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 畜産試験場動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年2月19日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 帯広畜産大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 奥田 潔



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 獣医学研究部門・教授

(氏名・フリガナ) 古岡 秀文 (フルオカ ヒデフミ)

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: 国立大学法人帯広畜産大学動物実験等に関する規程) | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立大学法人帯広畜産大学動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項)

- ・該当する□にチェックを入れること。
- ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年4月22日

厚生労働大臣

殿

機関名 甲子園大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中 村 秀 雄 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 栄養学部 教授
(氏名・フリガナ) 鎌田 洋一 ・ カマタ ヨウイチ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 有 無 | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--|--------------------------|--------|--------------------------|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|--|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 委託しているため) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 北海道大学) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

- (留意事項)
- ・該当する口チェックを入れること。
 - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

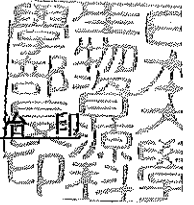
2019年4月26日

厚生労働大臣 殿

機関名 日本大学生物資源科学部

所属研究機関長 職 名 学部長

氏 名 大 矢 祐



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 生物資源科学部獣医学科・教授

(氏名・フリガナ) 壁谷 英則・カベヤ ヒデノリ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

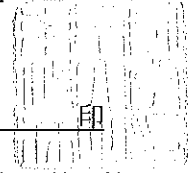
| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和元年 5月 17日

厚生労働大臣 殿

機関名 東京家政大学
所属研究機関長 職 名 学 長
氏 名 山本 和人



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進
2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 東京家政大学 教授
(氏名・フリガナ) 森田幸雄・モリタユキオ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 4月 9 日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立研究開発法人
医薬基盤・健康・栄養研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 米田 悦啓

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 霊長類医科学研究センター・センター長

(氏名・フリガナ) 保富 康宏 ・ ヤストミ ヤスヒロ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 医薬基盤・健康・栄養研究所 動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。