

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 29 年度～令和元年度 総合研究報告書

令和 2 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)

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」
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 |
| 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 |
| 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 (平成29年4月～平成31年3月まで) | 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 | 教授 |
| 森田 幸雄 | 東京家政大学 家政学部 | 教授 |
| 朝倉 宏 | 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 (平成31年4月～令和2年3月まで) | 部長 |

目次

| | | |
|-----|-------------------------------------|----|
| I. | 総合研究報告書（平成 29～令和元年度） | |
| | 食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究 | 1 |
| | 研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院） | |
| II. | 研究成果に関する刊行一覧表 | 17 |

1. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究
（H29-食品一般-004）
総合研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究院

研究要旨

英国で発生して世界に拡散した定型 BSE (C-BSE) は、飼料規制等の管理措置により発生は制御下にある。しかし、病型が異なる非定型 BSE (L-および H-BSE) が世界各地で摘発され不安視されている。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の推定に資する研究を進め、今後の管理措置の見直し等に必要な科学的知見として以下の成果を得た。

- 1) ウシ PrP 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより、H-BSE 感染牛の末梢神経系組織と骨格筋に中枢神経系組織の 1/3,000~1/20,000 程度、Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC) により、H-BSE および L-BSE 感染牛の空腸、回腸、および咬筋に中枢神経系組織の 1/1,000~1/100,000 程度、のプリオンが存在することが明らかとなった。L-BSE はヒトへの感染リスクがあることから、感染価は低いものの、可食部にプリオンが存在することは無視できない。
- 2) H-BSE は、C-BSE および L-BSE と異なり、霊長類への伝達リスクが低いことが明らかとなった。
- 3) L-BSE が経口ルートでサルに不顕性感染する可能性が示唆された。仮にヒトに不顕性感染する場合、脳外科手術などの医療行為による感染拡大を防止するために難しい対応が必要となる。
- 4) 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可能性が示唆された。

また、本研究では、我が国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムの構築を進めた。平成 29、30 年度の成績を踏まえて改訂した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証法プロトコール (案)」を、と畜場 (牛：8 施設、豚：12 施設) 並びに大規模食鳥処理場 (12 施設) で実証試験した結果から、本法が微生物学的な HACCP 検証法として実施可能な手法であることが確認できた。本法を実践するには、HACCP システムを評価するための基準値が必要となるが、本研究を通じ、EU 基準に比べて米国参考基準が、また、EU 基準および米国参考基準に比べ、平均値+2 SD がより厳しい基準値設定となると推察された。しかし、さらに全国的な成績を収集し我が国の実情に合った基準値を設定する必要があると考えられる。本研究の成果は、令和 3 年度には本格的に制度化される、と畜場および大規模食鳥処理施設の HACCP システムを外部検証する手法の科学的根拠を提供するものとする。なお、本プロトコールは、令和元年度総括・分担研究報告書の IV. その他の成果物に記載した。

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)

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 センター一長)

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) (平成29年4月～平成31年3月まで)

古岡 秀文 (帯広畜産大学・畜産学部・基礎獣医学研究部門 教授)

松浦 裕一 (国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 主任研究員)

山崎 剛士 (北海道大学・大学院獣医学研究院 助教)

鎌田 洋一 (甲子園大学・栄養学部フードデザイン学科 教授)

壁谷 英則 (日本大学・資源科学部獣医学科 教授)

森田 幸雄 (東京家政大学・家政学部 教授)

朝倉 宏 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 部長) (平成31年4月～令和元年3月まで)

A. 研究目的

スクレイパーがヒトに伝達する可能性 (Cassard et al, 2014)、孤発性 CJD 患者の様々な末梢組織にプリオンが存在すること (Takatsuki et al, 2016) など、プリオン病の病態の再考を促す知見が集積しているため、プリオン病のリスク管理に資するさらなる知見が必要である。L-BSE は経口ルートでサルに感染するので、食品を介してヒトに感染するリスクがあるが、H-BSE のヒトへの伝達性は明らかでない。また、非定型 BSE のみならず、プリオンが異種動物に伝播する過程で性状が変化してヒトへの感染性を獲得する可能性を含めて、感染リスクを判断する必要がある。

そこで、H-BSE を接種したサルの解析、および BSE プリオン増幅技術による非定型 BSE 感染牛の可食部および特定部位に存在するプリオンの定量化により、感染リスクの推定を行う。また、定量解析に必要な技術の改良と精度管理を行う。さらに、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを推定するため、カニクイザル、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。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・食鳥衛生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) 非定型 BSE 検出用 RT-QuIC の確立と、RT-QuIC による非定型 BSE 感染ウシ組織のプリオン感染価の推定。

C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC を確立するために、シカ組換えプリオンタンパク質 (rCerPrP)、ヒツジ組換え PrP (rShPrP-ARQ) など合計 6 種の PrP を用いて有用性を検討した。

H-および L-BSE を高感度に検出できる RT-QuIC を確立し、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]) の組織は農研機構・動物衛生部門から分与いただいた。各組織から、マルチビーズジョッカーを用いて 20% 乳剤 (PBS) を作製した。筋肉は Tissue glinder (BMP) を用いて 20% 乳剤を作製した。

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、ARF 値から、H および 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。

高濃度の組織乳剤により RT-QuIC が阻害されることを改善するために、酸化鉄磁性ビーズ (IOM) で異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を濃縮する方法を利用して、非定型 BSE プリオンを検出する RT-QuIC の改良を行った。

1-2) ウシ PrP 発現 Tg マウス (TgBov) を用いるバイオアッセイによる H-BSE 感染ウシ組織のプリオン感染価の測定。

TgBov を用いるバイオアッセイを実施し、H-BSE プリオンの感染価を測定する用量

反応標準曲線を作成した。H-BSE 実験感染牛 (発症期) の各種組織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。

12 箇所末梢組織 [末梢神経系組織：迷走神経 (頸部と胸部)、副腎；筋肉組織：最長筋、大腰筋、上腕三頭筋、半腱様筋、大腿四頭筋、咬筋；その他：唾液腺：舌下腺、耳下腺、下顎腺] を使用した。10% 組織乳剤の 0.02 ml をそれぞれ TgBov の脳内に投与した。

1-3) H-BSE 感染ウシにおける PrP^{Sc} 検出時期の推定。

H-BSE の感染試験に、ホルスタイン種雌牛 3 頭を用いた。各供試牛は麻酔処置し、直径 2 mm のピンドリルで前頭骨右側を貫通し、その貫通穴より 18G のカテラン針を用いて中脳を標的に穿刺し、H-BSE 感染牛の 10% 脳乳剤 (n=2) または BSE 非感染牛の 10% 脳乳剤 (n=1) を 1ml 脳内接種した。術後は BSE 隔離牛舎にて飼養し、経過観察を行った。ウシを用いて H-BSE の感染実験を行い、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。

1-4) 異種間伝播による BSE 株の性状変化の解析。

異種動物間伝達による BSE プリオンの性状変化を調べるため、各種齧歯類 (ハムスター、スナネズミ、モルモット) への伝達試験を行い、産生されるプリオンの性状と神経病理学的特徴を解析した。

1-5) プリオン異種伝播を模倣する試験管内プリオン増幅法に関する研究。

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、Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) 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。

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) を組み合わせて PMCA を行い、その効果を検討した。

シードプリオン株として C-BSE、H-BSE、L-BSE、非定型 Scrapie、CWD の 5 種類、PrP^C

ソースとして TgBov 脳乳剤 (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。

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) カニクイザルへを用いた H-BSE の感染試験。

H-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。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。定期的に尿、唾液、および脳脊髄液を採材して PrP^{Sc} を調べた。

行動観察は、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 of 行動から客観的にスコアリングできる指標を作成した。

高次脳機能評価として食物回収試験を実施した。

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、ウエスタンブロット (WB) 法により PrP^{Sc} を検出した。

2-2) L-BSE を連続継代したカニクイザルの解析および L-BSE を経口投与したカニクイザルの解析。

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実施した。国内で摘発された L-BSE 罹患牛 (JP24) 脳乳剤を脳内接種したサル (1 代目) および感染サル脳乳剤を脳内接種したサル (2 代目) のプリオンの分布並びに病理学的特徴を検索

した。また、L-BSE を経口投与されたサルの解剖を行い、プリオンの有無について検討した。

L-BSE 接種カニクイザルで産生される PrP^{Sc} を解析するためのプリオン増幅法の確立するために、RT-QuIC あるいは PMCA を改良して、L-BSE プリオンが伝達したカニクイザルの PrP^{Sc} 検出用を構築した。反応基質としてヒト PrP23-231 とヒト PrP90-231、反応バッファーとしては PIPES7.0 25 mM、NaCl 500 mM、EDTA 1 mM、そして SDS は 0~0.004% の条件で行い、最適化を図った。

3) TSE 確認検査の精度管理。

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

WB の精度管理用として、北海道大学から、C-BSE、H-BSE、L-BSE 各 1 検体、および非感染ウシ脳乳剤 2 検体の計 5 検体を国立感染症研究所研究所に、国立感染症研究所研究所からは、C-BSE2 検体、L-BSE1 検体、および非感染ウシ脳乳剤 2 検体を北海道大学に提供し、ブラインド試験を実施した。

免疫組織化学の精度管理として、BSE ウシおよび非感染ウシのギ酸処理済みのパラフィン包埋切片各 2 枚を帯広畜産大学と国立感染症研究所間でブラインドで交換し、各々の機関で免疫組織化学を実施し、その結果を北海道大学に送付し、結果の一致性と染色パターンを確認した。

<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の作成と検証

1-1) 妥当性検証試験プロトコール作成のためのデータ収集とプロトコール作成。

平成 29 年度は、ウシ、ブタ、食鳥それぞれのと体の数カ所についてふき取り検査を行い、一般生菌、大腸菌群、大腸菌、腸内細

菌科菌群、およびサルモネラの検出と定量を行い、衛生管理システムの評価手法を構築するための科学的根拠を収集した。

わが国の牛、豚をそれぞれ対象とした各2カ所のと畜場(牛:施設 B1、B2、豚:施設 S1、S2)、ならびに大規模食鳥処理場(C1、C2)を対象とした。採材部位は、牛については、3カ所(胸部;以降「胸」、ともばら、および肛門周囲部;以降「肛門」)、豚については、3カ所(胸、頸部;以降「頸」、肛門)とした。鶏については、はじめに採取部位間の比較を実施した。すなわち、施設 C2 で処理された10羽の鶏について、3カ所(胸、腹部;以降「腹」、モモ)からそれぞれ採材し、一般細菌数を比較した。

各検体を「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、指標細菌数を計測した。すなわち、拭き取り材料1ml量を終量10mlとなるように滅菌PBSに回収し、10倍階段希釈液を作成した。検体の1ml量を、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)に接種した。ACプレートは35°Cで48時間、EC、およびEBプレートは35°Cで24時間培養し、形成されたコロニー数を計測した。

サルモネラ属菌については、ペトリフィルムサルモネラ属菌測定システムを用いて測定した。すなわち、拭き取り材料1ml量を等量(1ml)の3Mサルモネラ属菌用前増菌基礎培地に接種し、41.5°Cで18時間培養(前増菌培養)後、培養物0.1ml量をラポポート・バシリアディスR10ブロス(R-VR10)10mlに加え、41.5°C、24時間培養(選択増菌培養)した。培養後、SALXプレートに塗抹し、41.5°Cで24時間した。さらに、選択増菌した後の培養物について、DHL、MLCB寒天培地にも併せて接種し、37°Cで24時間培養した。

1-2) 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の試行。

平成30年度に、平成29年度の成果をもとに作成した、「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(案)」を試行した。わが国の牛、豚を対象としたと畜場(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)を対

象とした。

「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(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。さらに試行試験実施後に、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、それぞれ問題点、改善点、その他意見を収集した。

1-3) 改良したと畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験び国内基準値設定の検討。

平成29、30年度の本研究の成果から「と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験令和元年度実施依頼プロトコール(案)」を作成した。と畜場(牛:8施設、豚:12施設)並びに大規模食鳥処理場(12施設)を検討対象とした。牛豚は本冷蔵庫搬入前にもばら(牛)、胸部(豚)の5cm x 5cm (25cm²)を切除法により採材した。鶏は本冷却後に首皮または胸皮計25gを切除法で採材した。週1回5検体を対象とし原則連続6週間採材した(1施設につき計30検体。一部7週間35検体)。各検体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数についてペトリフィルムを用いて測定した。

アンケート調査は平成30年度同様に実施した。

2) 検体採取法および検証法の改善に関する検討

2-1) 切除法の検討。

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。そこで、本研究では拭取法と切除法の比較を行った。牛、豚、および鶏の枝肉を使用し、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5cm x 5cmのステンレス版を用いて枝肉表面を切除した。

2-2) 採材面積の縮小の可能性に関する検討。

25cm²と100cm²の切除法を比較検討した。

牛は臀部、ともばら、胸部、豚は臀部、胸部、頸部の3か所の100 cm² (10 cm×10 cm) と25 cm² (5 cm×5 cm) を切除法により採取した。切除法は、切除面積が10 cm×10 cmのステンレス版を用いた。ステンレス板を枝肉と平行になるように当て、手術用滅菌メスで縦・横10 cmの切除枠に沿って浅くメスを入れた後(約2 mm)、ステンレスの板をはずし、滅菌ピンセットとメスで表面を切除した。隣接する場所に、切除面積が5 cm×5 cmのステンレス版を枝肉と平行になるように当て、手術用滅菌メスで縦・横5 cmの切除枠に沿って浅くメスを入れた後(約2 mm)、ステンレスの板をはずし、滅菌ピンセットとメスで表面を切除した。切除検体は、ストマッカー袋に入れ、計量した。10 cm×10 cm×約2 mmの切除検体は、90 mlのPBSを加え1分間、ストマッカー処理を行った。5 cm×5 cm×約2 mmの切除検体は、22.5 mlのPBSを加え1分間、ストマッカー処理を行った。その後、適宜、PBSを用いて10倍階段希釈を実施し、一般細菌数を計測した。

2-3) 新規採材部位の検討

新規採材部位としてウシの頸部および胸部を検討した。と畜場5施設につき、原則5本の枝肉を用いて、本冷蔵庫搬入前に、ともばら(1カ所/頭)、および頸部(1~5カ所/頭)の5 cm x 5 cm (25 cm²) から切除法により採材した。ペトリフィルムを用いて、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を計測した。

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

C. 研究結果

<BSE等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集>

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

1-1) 非定型BSE検出用RT-QuICの確立と、RT-QuICによる非定型BSE感染ウシ組織のプリオン感染価の推定。

rCerPrPに加えてrShPrP-ARQを用いることで、H-BSEとL-BSEを区別可能であることを見出した。H-BSEはrCerPrPでもrShPrP-ARQでも同様に増幅でき、また終濃度0.1%非感染牛脳乳剤存在下でもその反応は阻害されなかった。一方L-BSEはrCerPrPを基質とした場合と比べて、rShPrP-ARQを基質とした場合10¹乗程度反応が低下し、終濃度0.1%非感染牛脳乳剤存在下では、増幅効率が低下した。また、rShPrP-ARQを基質として0.1%非感染牛脳乳剤存在下でRT-QuICにより産生されるタンパク質分解酵素抵抗性PrP(PrP-res)の産生量は、L-BSEで明らかに少なかった。以上の結果から、rCerPrPとrShPrP-ARQを基質とするRT-QuICにより、H、L-BSEが識別可能となった。

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(Log10)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。

rCerPrPを基質とするRT-QuICの改良として、IOMを用いてPrP^{Sc}を濃縮してRT-QuICを行う方法は、平滑筋および骨格筋には応用可能であった。しかし、この方法を用いても、非定型BSE感染ウシの上腕三頭筋、大腿四頭

筋、背最長筋、および心筋からプリオンは検出されなかった。

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

1-2) ウ TgBov を用いるバイオアッセイによる H-BSE 感染ウシ組織のプリオン感染価の測定。

H-BSE 感染牛 10%脳乳剤の $10^0 \sim 10^6$ の希釈液を TgBov に脳内接種し、後 800 日まで観察したが、 10^6 希釈液では陽性 Tg マウスは確認されなかった。Spearman-Kärber 法により H-BSE 牛脳は 1g 中 $10^{7.4}$ LD₅₀/g の感染価であると算出された。また、H-BSE 牛脳の希釈液に相当する感染価の対数 (Y) ごとの TgBov の潜伏期間 (X) の分布から、用量反応標準曲線の変化ポイントを 10^{-3} 希釈液 ($10^{4.4}$ LD₅₀/g、Y=4.4) での潜伏期間 (平均 329 日、X₀) とした。その結果、H-BSE プリオンの用量反応標準曲線は、 $Y_1 = 19.32 + (-0.046) \times X$ ($1 < X < 329$) ; $Y_2 = 4.4 + (-0.0054) \times X$ ($329 < X < 800$) と算出された (相関係数 $R^2=0.9676$)。H-BSE 感染牛の組織の迷走神経頸部と副腎のプリオン感染価はそれぞれ $10^{3.8}$ LD₅₀/g と $10^{3.9}$ LD₅₀/g で、中枢神経 ($10^{7.4}$ LD₅₀/g) と比べて 1/3,000 程度の感染価であった。可食部筋肉の最長筋や半腱様筋、大腿四頭筋は、それぞれ $10^{3.1}$ LD₅₀/g、 $10^{3.0}$ LD₅₀/g、 $10^{3.0}$ LD₅₀/g の感染価が存在していた。脳と比べて、1/20,000 程度の感染価であると推定された。

1-3) H-BSE 感染ウシにおける PrP^{Sc} 検出時期の推定。

H-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、H-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、H-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。

1-4) 異種間伝播による BSE 株の性状変化の解析。

脳内接種による C-BSE 感染モルモット小脳では、クールーや sCJD-VV2 における小脳病変に類似した、特徴的な小脳皮質の萎縮がみられる。そこで、神経伝達物質トランスポーターを指標として形態学的に検討した。PrP^{Sc} が重度に沈着し、顆粒細胞の消失がみられる部位に一致して VGlu1 陽性シナプスの減少・脱落がみられた。脳幹部では、橋小脳路を構成する前庭神経核、橋核の VGlu1 陽性シナプスが減少していた。超微形態学的に、顆粒層の軽度病変では苔状線維の脱落、中等度病変では顆粒細胞樹状突起の変性、重度では苔状ロゼットの消失が認められた。

C-BSE がモルモットに伝達した際の特徴的な小脳病変が、由来する BSE の種類によるものか、用いた動物種によるものかを検討した。C-BSE/mo/ham (マウス→ハムスター異種間伝播株) 株を伝達したモルモットでも、小脳において顆粒層の減数および分子層の菲薄化が見られた。C-BSE 由来株を接種されたモルモットでは特徴的な小脳病変が再現される傾向が認められたが、L-BSE 由来株を接種されたハムスター (L-BSE/ham) では特徴的な小脳病変は認められなかった。今後、L-BSE/ham をモルモットに接種して小脳病変が再現されるかを確認する必要があるが、BSE の各種齧歯類への異種動物間伝達における病理学的特徴の維持は、動物種とプリオン株の双方に影響を受けるが、プリオン株の影響がより大きいことが示唆された。

1-5) プリオン異種伝播を模倣する試験管内プリオン増幅法に関する研究。

PMCA を用いて、プリオンの異種間伝播の効率と異種間伝播によるプリオン株の変化について解析を進めた。プリオンとして C-BSE、H-BSE、L-BSE、非定型 Scrapie、および CWD の 5 種類、PrP^C ソースとして TgBov、TgOv、KiCe の脳乳剤を用い、連続 PMCA を実施した。12 ラウンド目に増幅した PrP^{Sc} 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/TgBov-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)、TgBov マウスには感染しないこと (Tanguney et al., 2006) がわかっている。CWD/TgBov-PMCA 産物を接種した TgBov 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/TgBov-PMCA) を接種した TgBov マウスと有意差はなかった。さらに神経病理学的にも、CWD/TgBov-PMCA 産物を接種したマウスと、C-BSE を接種し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。

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) カニクイザルへを用いた H-BSE の感染試験。

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種ザル (#24, #25) は、接種後 4 年 5 ヶ月を経過したが、運動障害、異常行動は認められず、神経および精神症状は共に見られなかった。また、接種後 3 年 10 ヶ月に麻酔下で皮質脳波を測定したが、異常脳波は見られなかった。観察期間、体重は標準的な増加が見られた。経口投与ザル (#26, #27) も接種後 4 年 5 ヶ月を経過したが、運動障害、異常行動は認められなかった。

先の非定型 L-BSE 由来プリオンを脳内接種したサルでは 2 年以内に発症しており、その倍以上の期間を経ても H-BSE 脳内接種ザルでは発症は見られない。このことから、同じ非定型でも L-BSE 由来プリオンと H-BSE 由来プリオンは霊長類への伝達性に違いがあることが強く示唆された。

2-2) L-BSE を連続継代したカニクイザルの解析 および L-BSE を経口投与したカニクイザルの解析。

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。

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可能性について調べ た。C-BSE プリオンは C57BL/6J マウスへ伝 播可能であるのに対し、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。

L-BSE ウシ脳乳剤経口投与カニクイザル (#18, #19) は投与 6 年 3 ヶ月後に安楽死を行 った。両個体とも潜伏期に採取した体液中に PMCA で検出可能な微量の PrP^{Sc} が検出さ れたが、安楽死時点までに運動障害や自傷行 動以外の異常行動はなく、安楽死直後に脳の MRI 撮像を行ったが、発症した個体に見られ る脳室拡張を伴う脳萎縮等の異常所見は認め られなかった。また、剖検時の解剖所見も 脳を中心に特に異常は認められなかった (平成 26-28 年度総合報告書にて報告済み)。

2 頭のカニクイザル病理組織学的検索で は、中枢組織では空胞変性などのプリオン病 に特徴的な所見は認められず、抗プリオン抗 体を用いた免疫組織化学的検索においても プリオンの明らかな沈着は認められなかつ た。

そこで、カニクイザル検体を用いた RT- QuIC を確立して、L-BSE 経口投与カニクイ ザルにおけるプリオンの存在の有無を調べ た。L-BSE 経口摂取 6 年後に、臨床症状が認

められず安楽殺したカニクイザル 2 頭 (#18, #19) の組織からプリオン検出を試みたところ、2 頭の大脳皮質乳剤より RT-QuIC 陽性反応が観察された。一方、脾臓組織乳剤では陰性であった。従って、L-BSE が経口ルートでサルに不顕性感染することが示唆された。

3) TSE 確認検査の精度管理。

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

免疫組織化学の精度管理として、BSE ウシおよび非感染ウシのギ酸処理済みのパラフィン包埋切片各 2 枚を帯広畜産大学と国立感染症研究所間でブラインドで交換し、各々の機関で免疫組織化学を実施し、その結果を北海道大学に送付し、結果の一致性と染色パターンを確認した。BSE 感染と非感染ウシを正確に評価できており、染色パターンも適切であったことから、確認検査の精度は保たれていることが確認できた。

<と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発>

1) と畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコールの作成と検証

1-1) 妥当性検証試験プロトコール作成のためのデータ収集とプロトコール作成。

牛処理施設の細菌数の調査：2 施設 (B1、B2) で冷蔵前および冷蔵後に、肛門、ともばら、胸から拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。施設 B1 では拭き取り部位間で有意差は認められなかった。一方、施設 B2 では、冷蔵前の肛門で 4.1 cfu/cm^2 、ともばらで $1.9 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ 、胸で 7.5 cfu/cm^2 で、ともばらは、肛門に比べ、有意に高い値を示した。一方、冷蔵後では、拭き取り部位間で有意差は認められなかった。また冷蔵前で一般細菌数が多かったことから、冷蔵前のともばらの検体について施設間比較を行ったところ、施設 B1 で $1.3 \times 10^2 \text{ cfu/cm}^2$ 、同 B2 で $1.9 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ となり、施設 B1 の検体で有意に高い値を示した。

豚処理施設の細菌数の調査：2 施設 (S1、S2) で冷蔵前および冷蔵後に、肛門、胸、頸から拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、冷蔵前の検体において、施設 S1 で採取した検体の中央値は、肛門で 4.3 cfu/cm^2 、胸で $4.5 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ 、頸で $4.3 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意に高い値を示した。一方、施設 S2 では、部位間で有意差は認められなかった。また、施設 S1 で採取された検体の中央値は、冷蔵前後で、採材ポイント間で有意差は認められなかった。一方、施設 S2 では、冷蔵前で $1.3 \times 10 \text{ cfu/cm}^2$ 、冷蔵後で検出限界未満となり、冷蔵前の検体で有意に高い値を示した。また、施設間で一般細菌数に有意差は認められなかった。

鶏処理施設の細菌数の調査：施設 C2 で処理された 10 羽の鶏について、3 カ所(胸、腹、モモ) から採材し、一般細菌数を比較した。その結果、中央値が、胸で $4.9 \times 10^3 \text{ cfu/cm}^2$ 、腹で $5.6 \times 10^3 \text{ cfu/cm}^2$ 、モモで $5.3 \times 10^3 \text{ cfu/cm}^2$ と大きな差は認められなかった。2 施設 (C1、C2) でチラー後に、胸、モモからそれぞれ拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、施設 C1 では拭き取り部位間で有意差は認められなかったが、施設 C2 では、胸で $3.7 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ 、モモで $5.3 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ で、モモは胸に比べ、有意に高い値を示した。2 施設間で、胸、モモの一般細菌数を比較した。その結果、施設 C1 で採取した検体の中央値は、 $1.9 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ 、同 C2 で $4.4 \times 10^1 \text{ cfu/cm}^2$ で、施設 C2 は、同 C1 に比べ、有意に高い値を示した。

1-2) 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の試行。

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。

1-3) 改良したと畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験国内基準値設定の検討。

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

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

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

設であった。

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

これらの結果を基に、合格判定の暫定基準を提示した。今後、実際の検証試験の実施には、①1 年以上かけて、当該手法により得られた全国的な成績を収集し、改めてわが国の実情に合った基準値を設定する、②採材頻度について検討する、③条件付き合格の許容検体数などを設定する必要がある。

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

1-1) 非定型 BSE 検出用 RT-QuIC の確立と、RT-QuIC による非定型 BSE 感染ウシ組織のプリオン感染価の推定、および、ウシ PrP 発現 Tg マウス (TgBov) を用いるバイオアッセイによる H-BSE 感染ウシ組織のプリオン感染価の測定。

rCerPrP を基質に用いて、RT-QuIC の反応系に非感染牛脳乳剤を添加することで、C-BSE の PrP^{Sc} の増幅は完全に阻害されるが、L-/H-BSE の PrP^{Sc} の増幅は阻害されないことから rCerPrP を用いる RT-QuIC で C-BSE と L-/H-BSE は明確に区別可能となった。

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。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。RT-QuIC の改良を目的として、最近 Denkers らが報告した酸化鉄磁性ビーズ (IOM) (Denker et al., 2016) の使用により PrP^{Sc} を濃縮して阻害物質の影響を軽減させる方法を試みた。IOM を用いて PrP^{Sc} を濃縮することで、平滑筋および骨格筋組織では非定型 BSE プリオンの検出が改善した。この方法を用いても、非定型 BSE 感染ウシの上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋、および心筋からプリオンは検出されなかったことから、これらの組織にプリオンが存在しているとしても、感染価は非常に低いと考えられる。一方、末梢神経では IOM の有用性が認められなかったことから、IOM は万能ではなく、適用できる組織を明らかにした上で使用する必要がある。

CerPrP を用いることで、反応系に添加できる最大濃度の脳乳剤存在下でも微量の PrP^{Sc} を検出可能となるが、その特性には rCerPrP の N 末端側領域が関与することが明らかとなった。

平成 29 年から 3 年間の研究期間で、RT-QuIC によるプリオン検出法と TgBov を用いたバイオアッセイによるプリオン検出法を比較できる結果が得られた。RT-QuIC 法は 2 日程度で結果がえられ、簡便であり、かつ多検体を解析できる。一方、バイオアッセイは 2 年以上の期間を必要とし、多検体の解析には適さない。両者に長所短所はあるものの、バイオアッセイでは、可食部である骨格筋（大腿四頭筋、背最長筋、半腱様筋）から低レベルのプリオン感染価を検出できた。一方で、RT-QuIC では、酸化鉄磁性ビーズによる PrP^{Sc} 濃縮法を取り入れても、空腸、回腸、および咬筋からプリオンが検出されたが、上腕三頭筋、大腿四頭筋、背最長筋からはプリオンが検出されなかった。結果は完全に一致しないものの、簡便かつバイオアッセイに近い感度を有する RT-QuIC は、今後も組織におけ

るプリオン感染価の定量評価に有効な手法として活用できると思われる。

1-2) プリオン異種伝播を模倣する試験管内プリオン増幅法に関する研究。

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

2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

2-1) カニクイザルへを用いた H-BSE の感染試験。

H-BSE プリオン経口投与または脳内接種したカニクイザルは共に投与後 4 年 5 ヶ月を経過したが、発症はまだ見られていない。これまでの研究では、C-BSE プリオン脳内接種したサルは接種後 2 年 4 ヶ月～3 年 9 ヶ月で、L-BSE プリオン脳内接種したサルは接種後 1 年 7～8 ヶ月で発症した。従って、H-BSE プリオンは C-および L-BSE プリオンに比べ容易にはカニクイザルへ感染しないこと予想される。このことは、H-BSE プリオンは脳内接種により野生型マウス及び BoPrPTg マウスには伝達するが、HuPrPTg マウスへ伝達しないという報告と一致する結果である。従って、H-BSE のヒトへの感染リスクは、C-BSE および L-BSE と比較して低いと考えられるが、L-BSE 経口感染カニクイザル（接種後 6 年で安楽殺）が発症は認められないにもかかわらず、RT-QuIC で PrP^{Sc} 陽性となったことから、感染成立の有無を論じるためには、H-BSE プリオン接種カニクイザルの継続飼育が必要である。

2-2) L-BSE を連続継代したカニクイザルの解析および L-BSE を経口投与したカニクイザルの解析。

L-BSE 経口投与については、Mestre-Francé らのグループが、カニクイザルなどの真猿類より下等な原猿類であるハイイロネズミキツネザルでの伝播を報告したが、ヒトに近い真猿類

での論文報告はまだない。昨年度安楽死処置した L-BSE 経口投与カニクイザル（投与後 6 年を経過）は、神経症状、脳 MRI 撮像も異常所見は認められなかった。しかし、定期的に採取した脳脊髄液や尿などの体液から連続 PMCA で一時的に PrP^{Sc} が検出されことから、感染は成立している可能性は否定できなかった。しかし、RT-QuIC により、2 頭（#18, #19）の脳組織にある程度のプリオンが存在することが確認された。さらなる検証は必要であるが、L-BSE が経口ルートでカニクイザルのような真猿類にも感染が成立し、かつ不顕性感染となる可能性を示唆する重要な結果と思われる。

<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ルの作成と検証

1-1) 妥当性検証試験プロトコル作成のためのデータ収集とプロトコル作成。

本研究で対象とした、ウシのと畜場施設のうち、施設 B2 で、ともばらは肛門に比べて有意に多くの菌数が検出された。採材ポイントの検討では、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することと設定した。また、*Salmonella* が全く検出されなかったことから、本研究で対象とした施設では、同菌による牛肉の汚染は非常に少ないものと考えられた。

施設 B1 は同 B2 に比べ、多くの一般細菌が検出された。施設 B2 は対米国・EU 等牛肉輸出認定施設であり、施設 B2 で導入している HACCP システムは毎月、厚生労働省の査察を受けている。HACCP による衛生管理が機能が機能する一例と結果と思われる。

ブタのと畜施設では、施設 S1 では、胸、および頸からは、肛門に比べて有意に多くの一般細菌数が検出され、また、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することと設定した。施設 S1 および S2 は、いずれも世界食品安全イニシアチブ（GFSI）に所属する同じ HACCP 認証を取得

していおり、両施設で処理された豚枝肉の衛生状況は同程度であると考えられた。

鶏肉の採材部位の検討において、胸、腹、モモについて 10 羽からの拭き取り検体について検討したところ、何れの間にも有意差は認められなかった。これは、採材のタイミングが、チラー洗浄直後であることから、鶏と体のほぼ全域がチラー水に浸漬されるため、何れの部位においても同程度の細菌汚染をしていることを反映するものと考えられた。そこで、実際の作業実施上より簡便な作業となる「胸」、および「モモ」を拭き取り部位として設定した。

一方、鶏肉では糞便汚染細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）が、牛や豚に比べ高率に検出されたが、腸内細菌科菌群が最も高い割合で検出された。牛や豚は 1 頭ごとに使用器具等が消毒され個体で処理されるが、鶏の処理工程は連続で処理されている。本報告だけでなく、多くの国々の報告においても、鶏のふき取り検体は牛や豚のふき取り検体に比べ一般細菌、大腸菌群数、大腸菌等の検出割合は高率に、検出菌数は高値を示している。これは、鶏のふき取り検体の特徴であると思われた。

これらの結果は、「平成 30 年度版のと畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験プロトコル」を策定する上で、重要な科学的知見となった。

1-2) 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ルの試行。

問題点の抽出を目的として、本研究でプロトコ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、本プロトコルはスムーズに導入できるものと考えられた。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。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。

- ・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）

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が、検証したプロトコルは、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た。

1-3) 改良したと畜場・食鳥処理場 HACCP システムの妥当性検証試験及び国内基準値設定の検討。

令和元年度に改訂した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証プロトコル（案）」に従い、と畜場（牛：8 施設、豚：12 施設）並びに大規模食鳥処理場（12 施設）で実証試験を実施した。切除法による採材を行い、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を求めた。実施した実証試験の結果から、本研究班で作成した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証プロトコル（案）」の実施は、HACCP 導入施設における微生物学的な HACCP 検証手法として実施可能な手法であることが確認できた。

本研究で各施設から 1 週間に 5 検体、連続する 6 週間の採材、ならびに検査の実施（計 30 検体/施設）によって得られた一般細菌数、ならびに腸内細菌科菌群数を母集団として、国内のと畜場等の HACCP システムを評価するための国内基準値案を、1) EU の事例、2) 米国の事例、3) その他の統計学的評価手法により暫定的に算出した。その他の統計学的評価手法として、施設毎に微生物試験の成績から「平均値+2 SD」を算出して、EU 基準及び米国参考基準と比較検討した。その結果、牛では EU 基準の合格判定値 (m)、条件付き合格判定値 (M) の間にほとんどが含まれ、豚では、EU 基準の m ($4.0 \log \text{cfu/cm}^2$) より低値となるものがほとんどであった。すなわち、本研究で検討対象とした、国内のと畜場で処理された牛・豚枝肉は、EU 基準を満たし得る衛生状況を示すと考えられた。

一方、食鳥処理施設におけるデータは、各

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

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

E. 結論

本研究で得られた特に重要な知見を箇条書きで示す。

<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>

- ・ ウシ PrP 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより H-BSE 感染牛の末梢神経系組織と筋肉（大腿四頭筋、背最長筋、半腱様筋）のプリオン感染価は、脳と比べて、それぞれ 1/3,000 と 1/20,000 程度であることが明らかとなった。
- ・ RT-QuIC を用いて、非定型 BSE 感染牛組織のプリオン感染価を推定した結果、空腸、回腸、および咬筋から、中枢神経系組織の 1/1,000～1/100,000 のプリオンが検出された。
- ・ H-BSE は、C-BSE および L-BSE と異なり、霊長類に伝達しにくいことが示唆された。
- ・ L-BSE が経口ルートでサルに不顕性感染する可能性が示唆された。仮にヒトに不顕性感染する場合、脳外科手術などの医療行為による感染拡大を防止するために難しい対応が必要となる。
- ・ PMCA 法によるプリオン異種間伝播の解析から、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可能性が示唆された。
- ・ 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。

- ・ TSE 確認検査用のウエスタンブロット、免疫組織化学の検査精度が良好に保たれていることを確認した。

<と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発>

- ・ 試験に用いる採材法は、我が国で汎用されている拭取法よりも、国際的に使用実績のある切除法が、優れていることが明らかとなった。
- ・ 平成 30 年に実施した、「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証プロトコール（案）」の実証試験の結果、および事前・事後のアンケート結果から、「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証プロトコール（案）」を改訂した。
- ・ 平成 29 年、30 年の試験を経て令和元年度に作成した「と畜場・食鳥処理施設 HACCP システムの妥当性検証プロトコール（案）」の実証試験の結果から、本法は微生物学的な HACCP 検証法として実施可能な手法であることが確認できた。プロトコールは、令和元年度総括・分担研究報告書の IV. その他の成果物に記載した。
- ・ 牛・豚枝肉を対象とした切除法による妥当性検証法の実証試験を通じ、EU 基準に比べて米国参考基準が、また、EU 基準および比べて米国参考基準に比べ、平均値+2 S.D. がより厳しい基準値設定となること推察された。しかし、国内基準値設定には、1年以上かけて、さらに全国的な成績を収集し我が国の実情に合った基準値を設定する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
- II. 研究成果に刊行物一覧を掲載した。

2.学会発表

件数が多いため割愛した。各年度の総括・分担
研究報告書に記載した通りである。

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. 研究成果に関する刊行一覧表

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 |
|------|---------------|--------------|----------------|-------|-----|------|-----|
| 古岡秀文 | スクレイピー，牛海綿状脳症 | 日本獣医病理学専門家協会 | 動物病理カラーアトラス第2版 | 文永堂出版 | 東京 | 2018 | 212 |

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 |
|---|---|------------------------|------|------------|------|
| Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. | Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. | J. Gen. Virol. | 98 | 2615-2627 | 2017 |
| Satoh K, Atarashi R, Nishida N. | Real-Time Quaking-Induced Conversion for Diagnosis of Prion Disease. | Methods Mol. Biol. | 1658 | 305-310 | 2017 |
| Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M. | Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. | Bioorg. Med. Chem. | 25 | 1085-1093. | 2017 |
| Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. | Flow Cytometric Detection of PrPSc in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains. | J. Virol. | 92 | e011457-17 | 2017 |
| Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S. | Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice. | Biochem. Biophys. Rep. | 12 | 166-171 | 2017 |
| 森田幸雄 | 食肉処理施設における HACCP 導入による輸出促進の後押し—ハード面の施設とソフト面の構築の重要性— | 畜産コンサルタント | 53 | 42-47 | 2017 |
| 堀内 基広 | プリオン病治療実験モデル系確立の試み —免疫療法と細胞治療の可能性— | 臨床評価 | 44 | 712-718 | 2017 |
| 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, | Retrograde Transport by | Sci. Rep. | 8 | 12241 | 2018 |

| | | | | | |
|--|---|-------------------|----|-----------|------|
| Hasebe R, Horiuchi M. | Clathrin-Coated Vesicles is Involved in Intracellular Transport of PrP ^{Sc} in Persistently Prion-Infected Cells. | | | | |
| 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. | 3 | 206-219 | 2019 |
| Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. | Enhancement of binding avidity by divalent binding is a key mechanism for abnormal isoform of prion protein-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody 132. | PLoS One | 14 | e0217944 | 2019 |
| 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 | 846-850 | 2019 |
| Hagiwara K, Yuko Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Okemoto-Nakamura Y, Sata T, Horiuchi M, Shibata H, Ono F. | Tracking and clarifying differential traits of the classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys. | PLoS One | 14 | e0216807 | 2019 |
| Okemoto-Nakamura Y, Tanida I, Yamaji T, Hanada K, and Hagiwara K. | PRNP-disrupted human neuroblastoma cell line and its stable transformants expressing prion protein variants. | BPB Reports | 2 | 73-79 | 2019 |
| Sakaguchi S, Shintani S, Kamio K, Sekiya A, Kato S, Muroi Y, Horiuchi M, Furuoka H. | Selective neuronal vulnerability is involved in cerebellar lesions of Guinea pigs infected with bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions: Immunohistochemical and | Neuropathol. | 40 | 167-179 | 2020 |

| | | | | | |
|---|--|------------------|-----|-----------|------|
| | electron microscopic investigations. | | | | |
| Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Mori T, Atarashi R, and Nishida N. | Estimation of prion infectivity in tissues of cattle infected with Type I interferon protects neurons from prions in in vivo models. | Brain | 142 | 1035-1050 | 2019 |
| Fuchigami T, Kawasaki M, Koyama R, Nakaie M, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Ono M, Nishida N, and Nakayama M. | Development of radioiodinated benzofuran derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. | ACS Infect. Dis. | 5 | 2003-2013 | 2019 |