熊本県食肉衛生検査所における牛海綿状脳症 スクリーニング検査対応とデータ解析

原田誠也^{1)†} 大迫英夫¹⁾ 松本一俊¹⁾ 永田悦生²⁾
文藤繁樹¹⁾ 秋山雄介¹⁾

1) 熊本県食肉衛生検査所 (〒861-1344 菊池郡七城町大字蘇崎 1341)

2) 熊本県天草保健所 (〒863-0013 本渡市今釜新町 3530)

(2003年4月28日受付・2003年9月17日受理)

要 約

平成13年10月18日から全国の食肉衛生検査所で一斉にELISA法による牛海綿状脳症(BSE)スクリーニング検査が開始された。このBSEスクリーニング検査において、われわれは延髄採取のための薬匙の改良や小型のチャック付き採材用ポリ袋の採用等、検査用具の改良・工夫で短期間に一日あたり140頭の検査を達成することができた。検査開始から平成14年12月末日までに36,870頭のBSEスクリーニング検査を実施し、81頭の再検査を行ったが、確認検査のため国立感染症研究所へ送付した1例を含め、すべてBSE陰性であった。検査データを品種別、性別、年齢別に分類し、データ解析を行った結果、高齢の経産牛は他より若干OD値が高い傾向にあった($P<0.05$)。

——キーワード：BSE, ELISA法, OD値。

----- 日獣会誌 57, 121~124 (2004)

牛海綿状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy: BSE)は1986年に英国で初めて確認された牛のプリオン病で、感染牛の脳や脊髄等、特定部位の喫食等によってヒトに伝達し、変異型Creutzfeldt-Jakob病を起こすとされている[2, 3, 6, 7]。

2001年9月、国内初のBSEが千葉県で確認され、翌10月18日から全国のと畜場で一斉に、すべての牛を対象としたELISA法によるBSEスクリーニング検査が開始された。検査開始にあたり、われわれの検査所でも早急に検査機器や検査キット等を手配したが、全国の検査所が同時に発注したため納期が遅れ、検査開始の前日にやっと揃った状況であった。そのため、当初は検査頭数を制限したが、その後、検査用具の改良・工夫等により短期間に従来の検査頭数(140頭/日)を回復し、しかも、通常16時30分までには結果が得られるようになった。

また、2002年2月末には待望のBSEスクリーニング検査専用検査棟が完成し、3月1日から設備の整った新たな施設で検査を開始した。2002年12月までの累計検査頭数は3万8千頭を超え、かなり検査データが蓄積してきた。そこで、今回われわれがこれまで実施してきたBSEスクリーニング検査対応とデータ解析について報告する。

材 料 お よ び 方 法

検査材料：2001年10月18日から2002年12月31日の間に㈱熊本畜産流通センター(センター)でと畜・解体処理され、BSEスクリーニング検査を行った36,870頭の牛を対象とした。ただし、検査データの解析は2002年2月末のBSE専用検査棟新設による設備や環境の変化を考慮し、2002年3月1日から2002年12月31日までに検査した26,815頭分のデータを採用した。

検査方法：BSEスクリーニング検査は「牛海綿状脳症に関する検査の実施について」(平成13年10月16日付け、食発第307号)の牛海綿状脳症検査実施要領に従い、BSE検査キット^{a)}を使用して実施した。

この検査キットはBSEの原因とされる異常型プリオン蛋白質の精製キットと精製時に使用するタンパク分解酵素(Proteinase K: PK)およびプリオン蛋白質に対する2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法による検出キットからなっている。

検査工程は約1時間の精製工程と3時間弱の検出工程に大別され、最終的にマイクロプレート・リーダーによる試料のOD値が、カットオフ値(陰性対照4ウェルの

a) プラテリア BSE, 日本バイオ・ラッド㈱, 東京。

† 連絡責任者：原田誠也(熊本県食肉衛生検査所)

〒861-1344 菊池郡七城町蘇崎 1341 ☎0968-26-4231 FAX 0968-26-4233

平均OD値+0.210)以上を示せば陽性と判定する。ただし、カットオフ値の-10%以上を示したすべての検体は、保存しておいた門部分の乳剤から再検査を実施する。再検査は1検体につき2ウェルを使用し、1ウェルでもカットオフ値の-10%以上を示せば、このキットでは陽性と判定し、確認検査のため指定された検査機関に送付しなければならない。

データ解析：検体のOD値データを品種別（ホルスタイン、黒毛和種、褐毛和種、交雑種）、性別（去勢、未經産メス、経産）、年齢別（30カ月未満、30カ月～72カ月、72カ月以上）に分類してデータ処理し、一元配置の分散分析等により平均値の検定を実施した（ $P < 0.05$ ）。また、検査キットのロット毎の比較も行った。なお、カットオフ値に影響を与える陰性対照のOD値は測定ごとに多少変化するため、最初はカットオフ・インデックスを用いて解析を行った。しかし、カットオフ値の変動が十分に小さく生データの場合とほとんど同様の結果であったため、測定毎の誤差は無視し、分かりやすい生データを用いて検討した。

成 績

検査頭数の推移：一日当たりのBSEスクリーニング検査頭数は、開始日は24頭に制限したが、翌10月19日から48頭体制、10月29日から90体制と順調に増加した。その間、早期に従来の検査頭数を回復し、しかも勤務時間内に検査結果を得られるよう、延髄や門部分の採取をはじめ、精製工程で使用する用具等に種々の改良・工夫を加え迅速化・効率化を図った。すなわち、延髄採取では、延髄から伸びる神経等を簡単に切断できるよう、薬匙（21cm）の匙部両側にグラインダーで切込みを入れ、縁の部分を実鋭利に加工した改良薬匙を作製した。また、採材容器を角型シャーレから小型のチャック付ポリ袋（120×85mm^{b)}に変更し、さらに、袋の口を開けたまま保定できるホルダーを考案した。その他にも多検体を同時に操作できる用具等の利用・作製を行ったが、特に精製工程最終段階の加熱後攪拌・溶解には、強烈な振動でペレットを簡単に溶解できる強力なミキサー^{c)}を採用した。このような工夫の結果、11月13日から132頭体制となり、ほぼ1カ月でBSE検査前の検査頭数を回復することができた。なお、農業団体の要望により、2002年1月下旬から現行140頭（普通牛132頭、病牛8頭）体制となった。

また、われわれの検査所では、普通畜のBSEスクリーニング検査はすべてと畜検査当日に実施しているが、検査キットが高額であるためELISAプレートのウェルに無駄が出ないように、病畜の当日BSEスクリーニング

表1 BSE 検査結果

	検査頭数	スクリーニング検査				確認検査	
		1回目		再検査			
		陰性	陽性*	陰性	陽性	陰性	陽性
2001年10月	562	562	0	0			
11月	2,559	2,554	5	5			
12月	2,115	2,075	40	40			
2002年1月	2,361	2,358	3	3			
2月	2,458	2,454	4	4			
3月	2,958	2,958	0	0			
4月	3,120	3,110	10	9	1	1	0
5月	2,838	2,835	3	3			
6月	2,111	2,110	1	1			
7月	2,669	2,668	1	1			
8月	2,438	2,437	1	1			
9月	2,510	2,507	3	3			
10月	2,598	2,597	1	1			
11月	3,068	3,061	7	7			
12月	2,505	2,503	2	2			
total	36,870	36,789	81	80	1	1	0

* カットオフ値の90%以上を含む

検査頭数を調整している。

検査体制：現在、センターのと畜処理頭数は140頭体制であるが、頭数の増加に伴いBSEスクリーニング検査体制も変化した。普通牛132頭のと畜・解体処理は、7時45分からの生体検査後、8時30分に開始され、12時30分前後に終了する。そこで、検査頭数と時間を考慮した結果、BSEスクリーニング検査は6名（延髄採材：2名、検査：4名）で対応することにした。現場では採材担当2名が約30分交代で延髄の切り出しと採材補助（検体番号の確認・記録、採材済み頭部の移動等）を交互に行う。

一方、検査担当は9時頃から約20分間隔で現場に延髄を取りに行き、組織細胞破砕機（Fast Prep FP120）の効率を考慮した12頭分ごとにBSE検査棟に持ち帰り、先ず門部分の抜き取り、秤量、乳剤作製、規定量（500 μ l）分取を行う。その後、24頭分を一まとめにしてPK処理以下の精製工程を実施し、完成したELISA用試料はプレート接種まで冷蔵保存する。最後の延髄搬入は12時30分付近となり、1時間後の13時30分頃にはすべての試料が完成する。したがって、検査結果は通常約3時間後の16時30分までに得られている。

検査結果：検査を実施した36,870頭中81頭（0.22%）がカットオフ値の-10%以上のOD値を示し再検査となった。内訳は陽性59頭、カットオフ値の-10%以内22頭であり、特に2001年12月（40頭）と2002年4月（10頭）の再検査頭数が他の月より多かった。再検査では81頭中80頭は陰性と判定されたが、2002年4月の1頭が1ウェルのみカットオフ値の-10%の値をわずかに超え陽性となった。よって、国立感染症研究所に送付し確認検査を行なったが、結果は陰性であった（表1）。

b) ユニパック・マーク、アズワン(株)、大阪。

c) ボルテックスジェニー2（ターボミックス装着）、エムエス機器(株)、東京。

図1 陽性対照を用いた検量線

再検査防止対策：再検査した81頭はすべて陰性と判定されたことから、これらの1回目のスクリーニング検査結果は偽反応によるものと判断された。そこで、偽反応による再検査防止対策として、すべての検体で乳剤調整に必要な門部の重量を秤量し、規定重量以内（350 ± 40mg）であることを確認・記録すること、規定量（500 μl）の乳剤分取時にはキャリブレーション・シリンジで大きな粒子を吸い込まないようにゆっくりと多少多めに吸い取り、押し出しながら量を調整すること、同時に処理する24検体ごとにPK液を用時調整し、酵素活性の低下を防止すること等に特に注意した。

また、制度管理の一環として工程管理票を作成し、各処理工程の開始時間、反応温度、室温、洗浄液温度、試薬ロットを細かく記入するようにした。

データ解析：現在使用中の検査キットは定性用であるが、陽性対照を希釈して検量線を作成した結果、OD値0.0 - 1.3付近では直線性が確認された（図1）。検査データの大半はその範囲内であるため、品種別、性別、年齢別に分類してデータ解析を行ったところ、経産牛、高齢牛のOD値がやや高い傾向にあり、有意水準0.05で有意差が認められた（表2）。

なお、検体や陽性対照の平均OD値は、検査キットのロットによって若干差があり、特にロット番号2B0002と2C0003のキットは平均OD値が低かった（表3）。

考 察

BSEスクリーニング検査の開始から1年半が経過した。当初は国から次々と出される対策に戸惑いながら、いつ従来の検査頭数を回復できるか見当も付かない状況であったが、沢谷の報告[4]と同様、われわれの検査所でも所員全員が危機感を持ち、一丸となってと畜場の改造指示、特定危険部位の処置・指導、検査施設と器械の整備、人員の確保、陽性時の対応マニュアル作成とシミュレーションの実施、ELISA法の経験者と初心者らを組合せた技術研修等、数々のBSEスクリーニング検査対応に取り組んだ。その結果、検査開始までにと畜場改

表2 OD値の基礎統計量抜粋（品種別、性別、年齢別）

グループ	標本数	平均	分散	標準偏差
ホルスタイン	9,288	0.061	0.00070	0.026
黒毛和種	5,359	0.059	0.00063	0.025
褐毛和種	3,423	0.060	0.00069	0.026
交雑種	8,669	0.058	0.00060	0.024
去勢	17,129	0.059	0.00064	0.025
メス	5,461	0.059	0.00060	0.024
経産*	4,202	0.065	0.00075	0.027
30カ月未満	18,083	0.059	0.00062	0.025
30～72カ月	5,460	0.060	0.00065	0.025
72カ月以上*	2,449	0.067	0.00082	0.029

*OD値に有意差が認められ、経産牛、72カ月以上の高齢牛が若干高い傾向にあった。

表3 検査キットのロットによる平均OD値の比較

試薬ロット	検体数	検体	カットオフ値	陰性対照	陽性対照
1L0031	2,234	0.043	0.225	0.015	1.364
2A0001	6,086	0.074	0.222	0.012	1.301
2B0002*	1,364	0.060	0.221	0.011	1.082
2C0003*	1,246	0.044	0.217	0.007	1.090
2D0004	10,759	0.054	0.218	0.009	1.338
2F0006	5,130	0.066	0.224	0.014	1.449
total	26,819	0.057	0.221	0.011	1.271

*2B0002、2C0003のロットは陽性対照のOD値が低かった。

造等を含む大部分の作業を終え、BSE検査専任の嘱託獣医師5名を確保した。また、2002年2月末にはBSEスクリーニング専用の検査棟が完成し、設備の整った快適な環境で検査をすることができるようになった。

検査手技の面では、検査用具の改良・工夫で短期間に1日の目標検査頭数を達成したが、特に延髄採取時に用いる改良薬匙と小型チャック付ポリ袋は効果的であり、ほとんど手を汚すことなく、一人でも簡単・迅速に延髄採取が可能となった。また、小型チャック付ポリ袋は門部分の採取でも好結果をもたらし、袋の上から保定した延髄にサンプルシリンジを挿し込んで、いとも簡単に門部分を抜き取ることができる。そのうえ、初期に使用していたデイスボメスと角型シャーレに比べ、コストの面でも格段に経済的である。

一日当たりの検査頭数増加に伴い、再検査も徐々に発生してきたが、特に2001年12月と2002年4月の再検査数が他の月に比べかなり多かった。この中には多数の再検査試料が連続した番号で発生した事例が3回（40頭分）含まれている。われわれは24検体ごとにPKを用時調整しているが、この処理単位内に再検査試料が集中していることから、マイクロピペットの操作ミスによるPKの濃度不足が原因であろうと考えられた。これを除けば再検査数は41頭（0.11%）となり、ELISA法としてはまずまずの成績と思われる。なお、検体のOD値は

PKの処理時間を延長したり、濃度を上げたりすると著しく低下する。よって、偽反応の主因は、乳剤化が不十分で、正常型プリオン蛋白質が大きな粒子のまま分取され、PKの処理が不完全になることであろうと推定された。再検査数は検査員の技術習得とともに減少したが、現在でも月に数件程度の発生があり、嶽間澤らの報告[5]による超音波破碎機の併用等、何らかの改善策を検討する必要がある。

検査データ解析では、青野らの報告[1]と同様、高齢の経産牛（老廃牛、乳廃牛）のOD値が若齢牛に比べ少し高い傾向にあった。この原因として、高齢の経産牛は延髄に張りがなく萎縮したようなものが多く、白質や繊維質の混入等により、乳剤化が不十分になりやすいこと等が考えられた。

現在の検査キットはELISA法を採用しており、操作が簡単で感度が高く、多数の検体のスクリーニング検査法として最適[7]とされている。しかし、最近グライディング・チューブの液量不足の多いロットや陽性対照のOD値が低いロット等の問題も発生している。特に陽性対照は不安定で、OD値のバラツキが大きく、しかも検査時のOD値が1.00未満であれば再検査となる。この場合は同時に検査したすべての検体が対象となり、貴重な時間と経費の大変な無駄遣いとなることから、メーカーによる品質管理の強化が切に望まれる。

また、検体のOD値は測定に使用するマイクロプレート・リーダーによっても多少変動するが、カットオフ値付近の判定は非常に微妙であり、リーダーによって再検査の判定が異なる場合がある。よって、今後リーダーの精度管理も検討する必要がある。

BSE検査は大変な労力と経費を要するが、検査開始から1年半の間に全国で6例のBSE陽性牛と1例の判定保留牛が新たに発見され、検査が有効に機能していることが証明された。また、全国の検査頭数は2002年12月末で1,778千頭を超え、多数のデータが蓄積されている。よって、早急に検査データの解析を実施し、検査年齢の引き上げや偽陰性のない範囲でのカットオフ値の見直し等、実態に即したBSE検査制度の再検討が望まれる。

最後に、最近トレーサビリティ・システムが稼働し始め、インターネットの個体識別システムに10桁の耳票番号を入力すると、その牛の情報が示されるようになった。まだ情報量は十分とはいえないが、このシステムを充実させ、『From farm to table』の概念による総合食肉衛生管理を確立することで、国産牛肉の安全・安心を確保できるよう努力していかなければならない。

稿を終えるにあたり、BSE検査用器具の改良や工夫にご努力いただいた井上博詮先生、橋詰公人先生、坂口弘一先生、小山順之先生、内山由香先生に深謝する。

引用文献

- [1] 青野 学：平成14年度食肉衛生技術研修会抄録，112-113（2003）
- [2] 原 一広，小野寺 節：モダンメディア，245-251，10（2001）
- [3] 池田修一：モダンメディア，252-256，10（2001）
- [4] 沢谷廣志：日獣会誌，191-195，3（2002）
- [5] 嶽間澤由紀子，北山友子，安田峰則，清水俊一，横山良秀：平成14年度日本獣医公衆衛学会年次大会抄録，418-419（2003）
- [6] 山内一也：日食微誌，92-97，18（2001）
- [7] 山内一也，小沢義博：月間HACCP，26-39，11（2001）

Bovine Spongiform Encephalopathy Test at the Kumamoto Prefectural Meat Inspection Office and Data Analysis

Seiya HARADA^{*†}, Hideo OSAKO, Kazutoshi MATSUMOTO, Etsuo NAGATA, Shigeki BUNTOH and Yusuke AKIYAMA

^{*} Kumamoto Prefectural Meat Inspection Office, 1341 Sozaki, Shichijo-machi, Kikuchi-gun, 861-1344, Japan

SUMMARY

Within a relatively short period after Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) screening test employing the Enzyme-linked Immunosorbent Assay was implemented in Japanese meat-inspection centers on October 18, 2001, we were able to examine 140 head of cattle per day. This was possible because of such instrument improvements as a modified medical spoon and a small, zippered sample bag for collecting brain stems. Of the 36,870 head we had treated by the end of December, 2002, 81 were subjected to retests. All retested samples, including a specimen further subjected to a confirmation test, turned out to be negative. In addition, we classified the cattle by species, sex, and age and compared optical densities (OD) among the groups. The OD values of old cows were found to be slightly, but significantly, higher than those of younger animals ($P < 0.05$).

— Key words : BSE, ELISA, optical density (OD). —

[†] Correspondence to : Seiya HARADA (Kumamoto Prefectural Meat Inspection Office)

1341 Sozaki, Shichijo-machi, Kikuchi-gun, 861-1344, Japan TEL 0968-26-4231 FAX 0968-26-4233
— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 57, 121 ~ 124 (2004) —