

調査資料**2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果（平成 19 年度）**

草間 豊子*

**A Monitoring of Animal Protein Contamination in Feeds
as a Measure to Prevent BSE in Japan (2007)**

Toyoko KUSAMA*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

To prevent the establishment and amplification of bovine spongiform encephalopathy (BSE) through animal feed in Japan, the use of mammalian protein for food-producing animals and the use of animal protein for production of feed for ruminants have been prohibited since October 2001. The Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) is engaged in the analysis of feed samples for presence of animal protein as an audit inspection agency of this feed ban. In fiscal year 2007, the FAMIC analyzed 189 samples of domestic feeds for cattle, 31 samples of imported feeds for cattle and 198 samples of animal by-products for contamination of ruminant protein, using three methods: microscopy, which detects animal origin bone tissue; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), which detects animal origin protein; and polymerase chain reaction (PCR), which detects animal origin DNA. None of domestic and imported feed samples for cattle was contaminated with prohibited animal protein. None of 31 samples of chicken meal, 18 samples of feather meal, 113 samples of fish meal, 27 samples of meat-and-bone meal of pork-origin and pork-and-chicken-origin was contaminated with ruminant protein.

Key words: 牛海綿状脳症 bovine spongiform encephalopathy (BSE); 飼料 feed; 動物質性飼料 animal by-products; 肉骨粉 meat-and-bone meal (MBM); 飼料規制 feed ban; ほ乳動物由来たん白質 mammalian protein; 反すう動物由来たん白質 ruminant protein; 顕微鏡鑑定 microscopy; 酵素免疫測定法 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); PCR 法 polymerase chain reaction

1 緒 言

牛海綿状脳症（BSE）の発生防止のため、独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは以前から顕微鏡鑑定による配合飼料中の肉骨粉混入検査を実施してきたが、平成 13 年 9 月に国内で牛海綿状脳症が発生したのを契機として、試験研究機関の協力の下、顕微鏡鑑定法¹⁾を補完する手法として PCR 法¹³⁾⁻²¹⁾及び ELISA 法²²⁾⁻²⁴⁾による肉骨粉の高感度検出及び動物種の識別法の開発に取り組み、飼料分析法²⁾⁻⁴⁾として確立し、漸次、国内の飼料のモニタリング検査に適用してきた。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

平成 13 年度にこれらの分析手法による魚粉中の牛・豚由来たん白質等のモニタリングを開始し、平成 14 年度以降は、国内の動物質性飼料及び牛用配混合飼料について、本格的な動物由来たん白質のモニタリングを実施し、その結果を報告^{6)~12)}してきた。

平成 19 年度は、飼料製造工程において牛用飼料に鶏豚用飼料原料の動物由来たん白質が混入するいわゆる交差汚染の防止及び、飼料規制の実効性を確認するため、牛用配混合飼料のモニタリング検査を重点的に実施した。また、飼料原料として、動物由来たん白質等が含まれないことについて農林水産大臣確認の必要な動物質性飼料のチキンミール、フェザーミール、魚粉、豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉等について、引き続き大臣確認に伴うモニタリング検査を行った。さらに、輸入飼料の監視強化に伴い、輸入の牛用の混合飼料や飼料原料についてもモニタリング検査を実施した。

モニタリング試験項目は、BSE 発生リスクを考慮し、反すう動物由来たん白質の検査を重点的に実施することとし、家きんや豚由来たん白質の検査は必要に応じて実施することとした。また、平成 18 年 3 月に、反すう動物由来肉骨粉に対して特異性が高く、乳製品の影響を受けない ELISA 法（メライザキット法）が通知^{2), 4)}に記載されたことから、豚肉骨粉及びチキンミール等の検査に適用するとともに、輸入飼料への適用の可否についても検討を行った。

今回、平成 19 年度に実施した飼料中の動物由来たん白質等のモニタリング検査結果をとりまとめたので、その概要を報告する。

2 材料及び方法

2.1 試料

平成 19 年 4 月から平成 20 年 3 月までに、独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（さいたま市）、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターが、国内の飼料原料工場、配混合飼料工場及び港湾倉庫等で採取した動物質性飼料 198 検体、国内製造牛用配混合飼料 189 検体及び輸入牛用飼料 31 検体の計 418 検体をモニタリング対象とした。

動物質性飼料としては、国内で製造されたチキンミール、フェザーミール及び豚血粉（以下「チキンミール等」という。）、豚由来肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉（以下「豚肉骨粉等」という。）並びに、魚粉や魚荒かす等（以下「魚粉等」という。）を主に収集したが、その他にこれらを主体とした混合飼料やフィッシュソリュブル吸着飼料についても収集し、調査を実施した。

牛用配混合飼料としては、育成用、成牛用を問わず幅広く収集した。なお、脱脂粉乳や乾燥ホエー等の乳製品を 10%以上含む代用乳等は、対象から除外した。

輸入飼料は、牛用配混合飼料を主体とし、一部牛用（A 飼料）の単体飼料（加熱加工等処理を行った包装品）及び飼料添加物を採取した。

試料の採取は、飼料等検査実施要領⁵⁾の病原微生物検査用試料の採取方法に従い、滅菌済み手袋及び滅菌済みスコップを使用し、滅菌済み採取袋に約 500 g を採取した。試料は試験までの間、冷蔵保管した。

2.2 試験実施場所

試験は、それぞれの試料を収集した各センターの試験室において実施した。

2.3 方法

試験は、以下に示す3法により行った。また、対象飼料別の試験項目を表1に示した。

1) 顕微鏡鑑定

「反すう動物用飼料への反すう動物由来たん白質の混入防止に関するガイドライン」¹⁾に従い、図1の方法で獣骨・獣毛・羽毛等（以下「肉骨粉等」という。）の有無を鑑定した。

なお、検出した場合には、牛用配合飼料に肉骨粉を0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5及び1%添加した鑑定用対照試料を試料と同時に処理し、肉骨粉等の混入量を推定した。

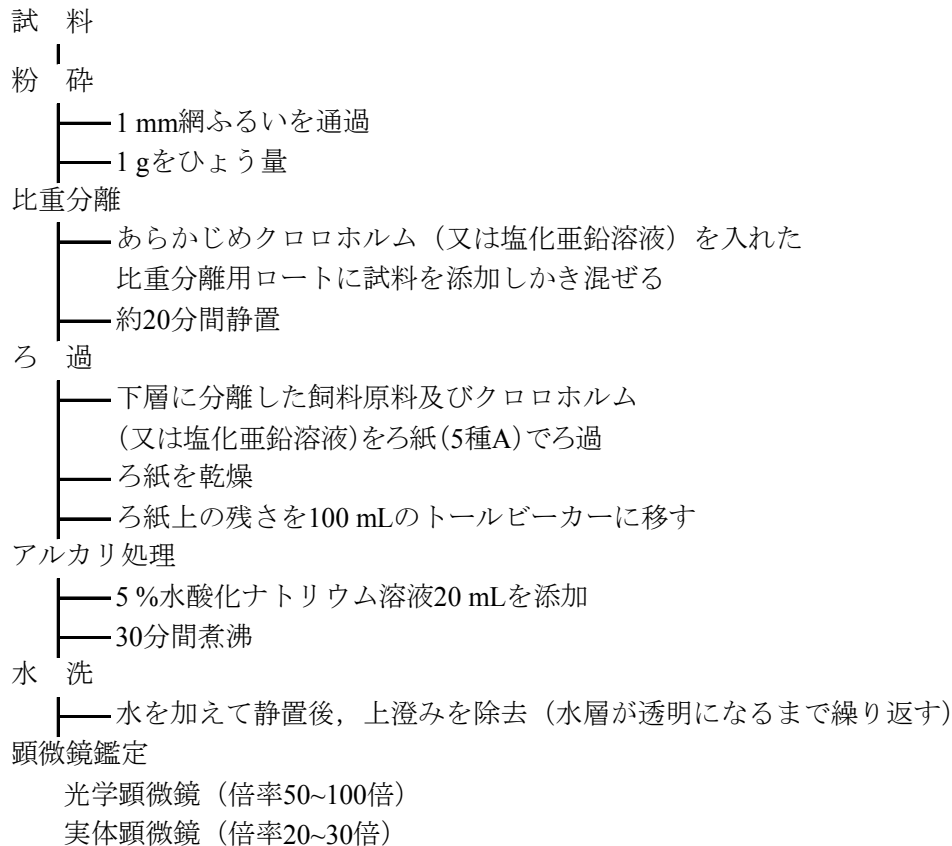


図1 飼料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

2) ELISA 試験

「ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法」^{2)~4)}に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及び輸入飼料中の牛由来たん白質については「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」（森永生科学研究所製、以下「モリナガキット」という。）を用い、チキンミール等及び豚肉骨粉等中の反すう動物由来たん白質については、「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」（ELISA Technologies 製、以下「メライザキット」という。）を用いて試験を実施した。また、輸入飼料へのメライザキットの適用の可否について調査を行った。

なお、平成19年度は、平成18年度と同様に、ELISAによる鶏由来たん白質及び豚由来たん白質の試験は実施しなかった。

試験は1検体あたり2点併行で実施し、2点の結果が一致して陽性あるいは陰性の場合に、陽性あるいは陰性と判定した。2点の結果が一致しない場合には、再試験を実施し、再試験の

結果，2点の結果が一致しない場合には，陰性と判定した．

試験の概要は以下のとおり．

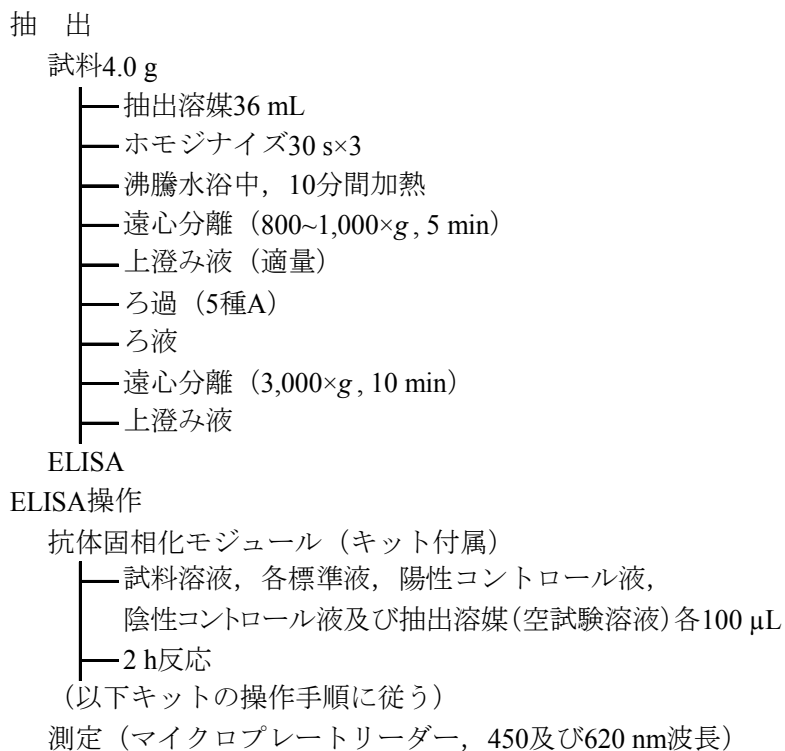


図 2-1 「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」による試験方法

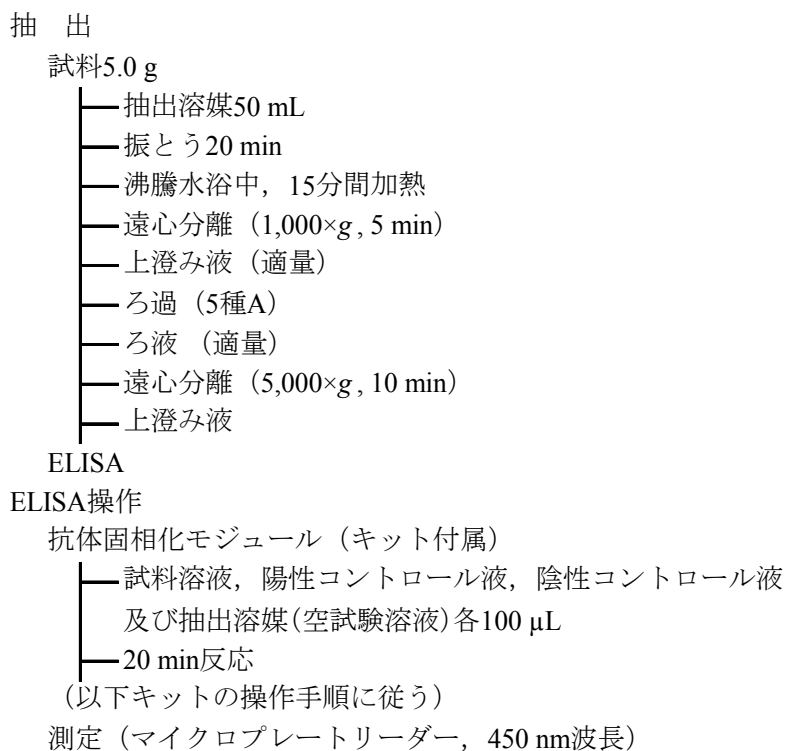


図 2-2 「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」による試験方法

3) PCR 試験

「PCR による飼料中の動物由来 DNA の検出法」^{2)~4)}に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及びチキンミール等の飼料ではほ乳動物由来 DNA の検出を行い、ほ乳動物由来 DNA が検出された場合には、牛由来 DNA 及び豚由来 DNA の検出を行った。豚肉骨粉等の試験では、反すう動物由来 DNA の検出を行い、反すう動物由来 DNA が検出された場合には、牛由来 DNA の検出を行った。乳製品又はゼラチンの添加又は混入の可能性のある牛用配混合飼料、輸入飼料、豚肉骨粉等及び魚粉等については、乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法（以下「乳製品等除去処理」という。）^{2), 4), 17), 18)}を行った。

同時に DNA の抽出確認のためのコントロールとして、牛用配合飼料については植物由来 DNA の検出⁴⁾を、魚粉等については魚類由来 DNA の検出^{4), 14)}を、チキンミール等及び鶏豚検量混合肉骨粉については家きん由来 DNA の検出^{4), 15)}を、豚肉骨粉についてはほ乳動物又は豚由来 DNA の検出等^{4), 13), 21)}を行い、コントロール DNA が検出されない場合には、DNA の再抽出を行った。

プライマーは、ほ乳動物検出プライマー対 [anicon 3, anicon 5]（プロメガ製、平成 19 年度当時はテキサスジェノミクスジャパン製、以下同じ。）、反すう動物検出プライマー対 [rumicon32, rumicon52]、牛検出プライマー対 [cow 31, cow 52]、豚検出プライマー対 [pig 32-2, pig 5-3]、家きん（鶏・うずら）検出プライマー対 [chick3-1, chick5-1]、植物検出プライマー対 [placon 3, placon 5] 及び魚類検出プライマー対 [FM3, FM5] を用いた。

なお、上記の反すう動物検出プライマー対及び豚検出プライマー対については、PCR 反応条件が他のプライマー対と異なることなどから、平成 19 年度に新たに反すう動物検出プライマー対 [rumicon 3D5, rumicon 5D2] 及び豚検出プライマー対 [pig 3-6, pig 5-6] を開発^{19)~21)}した。これらのプライマー対は、平成 20 年 4 月に飼料分析基準⁴⁾に追加収載されたことから、平成 20 年度以降は、これらのプライマー対により検査を行っている。

試験は 1 検体当たり 2 点併行で実施し、2 点ともに陽性の場合に検出と判定し、2 点の結果が一致しない場合及び 2 点とも陰性の場合には、不検出と判定した。

試験の概要は、図 3 に示した。

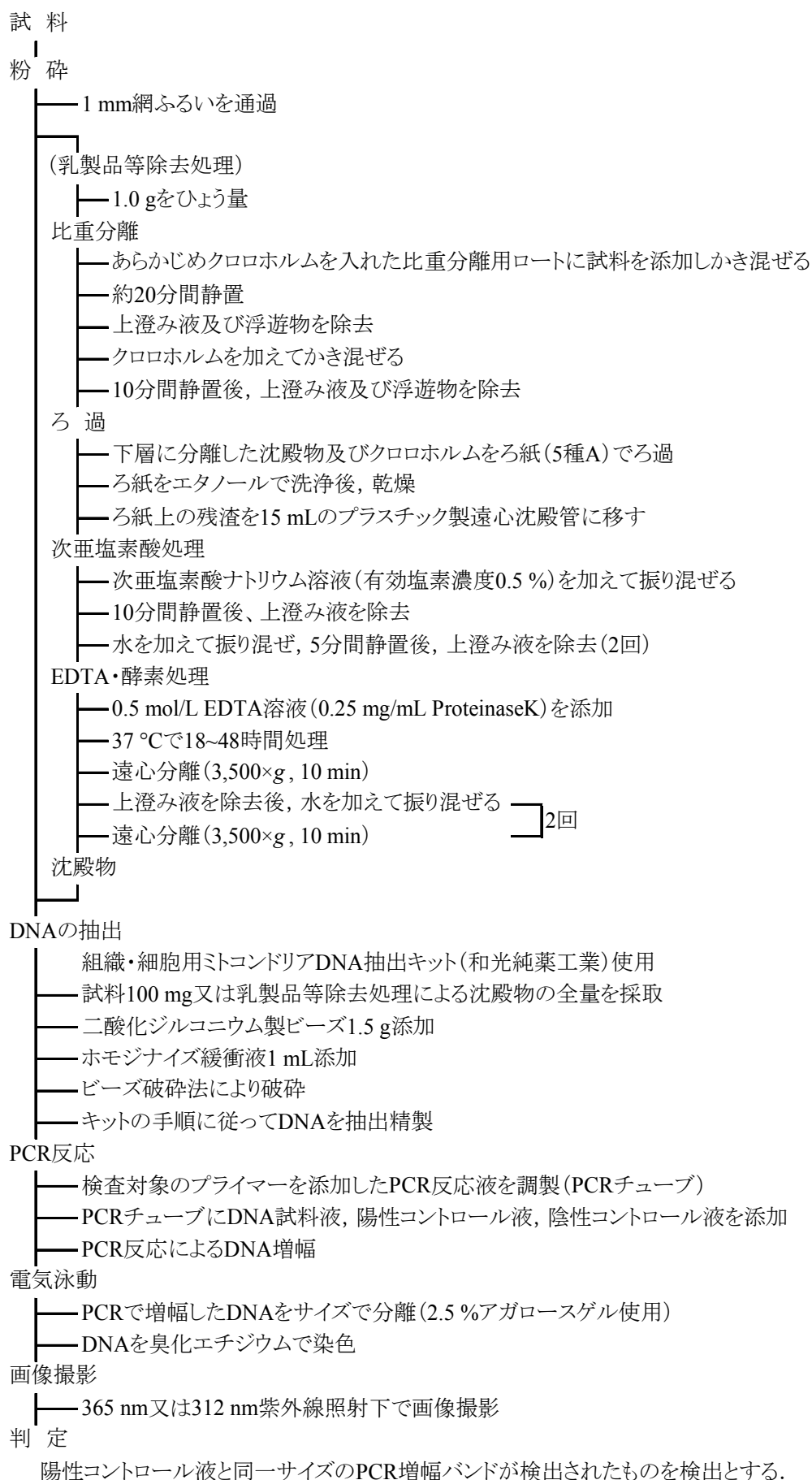


図3 PCR法による動物由来DNAの検出方法

表 1 対象試料別の試験項目

| 対 象 試 料 | 顕 微 鏡 鑑 定 | 試 験 項 目 | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------|---|
| | | ELISA | | | | PCR | | | | | |
| | | 反すう動物 (メライザ キット) | 牛 (モリナガ キット) | 豚 (ELISA- TEK キット) | 鶏 (モリナガ キット) | ほ 乳 動 物 | 反 す う 動 物 | 牛 | 豚 | 鶏 | |
| 牛用配混合飼料 | ○ | — | ○ | — | △ | ○ | — | △ (ほ乳+の場合) | △ (ほ乳+の場合) | △ | |
| 魚粉等 | ○ | — | ○ | △ | △ | ○ | — | △ (ほ乳+の場合) | △ (ほ乳+の場合) | △ | |
| チキンミール・ 血粉等 | 家きん由来 | ○ | ○ | — | △ | — | ○注1) | — | △ (ほ乳+の場合) | △ (ほ乳+の場合) | — |
| | 豚又は 馬由来 | ○ | ○ | — | — | △ | — | ○ | △ (反すう+の場合) | — | △ |
| 豚由来肉骨粉 | — | ○ | — | — | △ | — | ○ | △ (反すう+の場合) | — | △ | |
| 原料混合肉骨粉 | 豚及び 家きん由来 | — | ○ | — | — | — | ○ | △ (反すう+の場合) | — | — | |
| 輸入飼料 | A飼料 | ○ | — | ○注2) | — | △ | ○注1) | — | △ (ほ乳+の場合) | — | △ |
| | B飼料 | ○ | ○ | — | — | △ | — | ○ | △ (反すう+の場合) | — | △ |

○ 必ず実施する試験項目

△ 必要に応じて実施する試験項目

— 試験不要

注 1) 平成 20 年度以降は反すう動物由来 DNA の検出を実施

2) 平成 20 年度以降はメライザキットにより反すう動物由来たん白質の検出を実施

5) 動物由来たん白質等の判定方法

顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験の結果から、以下の手順で動物由来たん白質の有無を判定した。

豚肉骨粉等を除く試料について顕微鏡鑑定を実施し、獣骨・獣毛等の組織が検出された場合には「肉骨粉検出」と判定した。

顕微鏡鑑定の結果にかかわらず、全試料について ELISA 及び PCR 試験を実施し、試験結果が同一の動物種について一致して陽性であった場合に、動物由来たん白質・DNA (以下「動物由来たん白質等」という。) 検出と判定した。

なお、モリナガキットを用いた ELISA 試験では、反すう動物用飼料への使用が認められている乳製品の添加により牛由来たん白質が検出される場合があることから、乳製品の混入の可能性のある飼料については、乳製品等除去処理 PCR 試験を実施し、PCR 試験の結果牛由来 DNA が確認された場合にのみ検出と判定した。

3 結果及び考察

3.1 動物質性飼料のモニタリング

動物質性飼料 198 検体について、ほ乳動物あるいは反すう動物由来たん白質等のモニタリング

を行った。198 検体の試料の内訳は、チキンミール等 50 検体、魚粉等 113 検体、豚肉骨粉等 27 検体、その他動物性たん白質を含む飼料 8 検体であった。

これらのモニタリング集計結果は、表 2 に示したとおりであり、動物質性飼料 198 検体のうち、反すう動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。

平成 17 年度までは、家きん由来たん白質等のモニタリングも同時に実施していたが、平成 18 年度以降は、BSE 発生リスクの高い反すう動物由来たん白質等について重点的にモニタリングを行うこととし、家きん由来たん白質等のモニタリングは実施していない。

表 2 動物質性飼料のモニタリング結果（平成 19 年度）

| 動物質性 飼料の区分 | 飼料の種類 | 試験 検体数 | 反すう動物由来たん白質等 | |
|---------------|-----------------------|-----------|--------------|---------|
| | | | 検出数 | 検出率 (%) |
| チキンミール等 | チキンミール | 31 | 0 | 0.0 |
| | フェザーミール | 18 | 0 | 0.0 |
| | 豚血粉 | 1 | 0 | 0.0 |
| | 小 計 | 50 | 0 | 0.0 |
| 魚粉等 (内訳) | 輸入魚粉 | 3 | 0 | 0.0 |
| | 国内製造魚粉等 | 110 | 0 | 0.0 |
| | 魚粉・魚アラ粕 | (95) | | |
| | だし粕 | (6) | | |
| | イカミール | (2) | | |
| | カニ殻 | (2) | | |
| | 魚鱗コラーゲン | (1) | | |
| | イカ内臓発酵物 | (1) | | |
| | 酵素処理魚抽出物 | (2) | | |
| | フィッシュソリュブル | (1) | | |
| 小 計 | 113 | 0 | 0.0 | |
| 豚肉骨粉等 | 豚肉骨粉 | 4 | 0 | 0.0 |
| | 鶏豚原料混合肉骨粉 | 22 | 0 | 0.0 |
| | 豚蒸製骨粉 | 1 | 0 | 0.0 |
| | 小 計 | 27 | 0 | 0.0 |
| その他 | 魚介類由来原料を主体とした混合飼料 | 5 | 0 | 0.0 |
| | 魚粉・大豆油かす 2 種混合飼料 | 1 | 0 | 0.0 |
| | フィッシュソリュブル吸着飼料 | 1 | 0 | 0.0 |
| | フェザーミール・大豆油かす 2 種混合飼料 | 1 | 0 | 0.0 |
| | 小 計 | 8 | 0 | 0.0 |
| 合 計 | | 198 | 0 | 0.0 |

1) チキンミール等

チキンミール 31 検体、フェザーミール 18 検体及び豚血粉 1 検体の計 50 検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリングを行った。

試験は、すべての検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験を実施した。ELISA 試験は、平成 18 年度にチキンミール等を用いて ELISA キットの評価を行った結果、チキンミール

ル等中の反すう動物由来たん白質の検出には、モリナガキットよりメライザキットが特異性の点で良好であると判断された¹¹⁾ことから、平成 19 年度は、メライザキットを用いて試験を実施した。

試験の結果は、表 3 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。また、メライザキットを用いた ELISA 試験の結果は、すべての検体で反すう動物由来たん白質が陰性であり、PCR によりほ乳動物由来 DNA の試験を行った結果は、すべての検体でほ乳動物由来 DNA が検出されなかった。したがって、総合判定ではすべて反すう動物由来たん白質等不検出と判定された。

表 3 チキンミール等の試験結果 (平成 19 年度)

| 試験方法 | 検出対象 | 試験検体数 | 陽性数 | 陽性率 (%) |
|----------|----------------------------|-------|-----|---------|
| 顕微鏡鑑定 | 獣骨・獣毛 | 50 | 0 | 0.0 |
| ELISA 試験 | 反すう動物由来たん白質 ^{注1)} | 50 | 0 | 0.0 |
| PCR 試験 | ほ乳動物由来 DNA | 50 | 0 | 0.0 |
| | 牛由来 DNA | 50 | 0 | 0.0 |
| | | 試験検体数 | 検出数 | 検出率 (%) |
| 総合判定 | 反すう動物由来たん白質・DNA | 50 | 0 | 0.0 |

注 1) メライザキットによる

2) 魚粉等

国内で製造した魚介類由来たん白質を含む魚粉等 110 検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを行った。魚粉等の内訳は、表 2 のとおり、魚粉・魚アラ粕 95 検体、だし粕 6 検体、イカミール 2 検体、カニ殻 2 検体、魚鱗コラーゲン 1 検体、イカ内臓発酵物 1 検体、酵素処理魚抽出物 2 検体及びフィッシュソリュブル 1 検体であった。

輸入魚粉については、平成 15 年度以降、農林水産省動物検疫所による輸入時の検査との重複を避けるため、製造事業所での採取を原則として取りやめたことから、平成 19 年度は 3 検体のみであった。輸入魚粉 3 検体の輸入先国はいずれもタイであった。

ほ乳動物由来たん白質等の試験の結果は、表 4 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなく、ELISA 及び PCR 試験ではほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。モリナガキットによる ELISA 試験では、魚粉 1 検体で牛由来たん白質が陽性であったが、乳製品等除去処理による PCR 試験において、牛由来 DNA が検出されなかったことから、総合判定ではほ乳動物由来たん白質等が不検出と判定された。

なお、平成 18 年度に魚粉等の ELISA 及び PCR 陽性事例について調査した結果、乳製品やゼラチンを添加した水産練り製品等の混入の可能性が示唆された。平成 18 年度以降、魚粉等の検査にあたり、PCR 陽性検体については、乳製品等除去処理 PCR による確認試験を実施している。

表 4 魚粉等の試験結果（平成 19 年度）

| 試験方法 | 検出対象 | 試験検体数 | 陽性数 | 陽性率 (%) |
|--------------|------------------------|-------|-----|---------|
| 顕微鏡鑑定 | 獣骨・獣毛 | 113 | 0 | 0.0 |
| ELISA試験 | 牛由来たん白質 ^{注1)} | 113 | 1 | 0.9 |
| PCR試験 | ほ乳動物由来DNA | 113 | 1 | 0.9 |
| | 牛由来DNA | 113 | 0 | 0.0 |
| | | 試験検体数 | 検出数 | 検出率 (%) |
| 総合判定 (内訳) | ほ乳動物由来たん白質・DNA | 113 | 0 | 0.0 |
| | 牛由来たん白質・DNA | 113 | 0 | 0.0 |

注 1) モリナガキットによる

3) 豚肉骨粉等

平成 17 年 4 月に豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉の鶏豚用飼料への使用が認められたことから、平成 17 年度以降、豚肉骨粉等のモニタリング検査を実施¹⁰⁾¹¹⁾している。

平成 19 年度は、表 2 に示したように豚肉骨粉 4 検体、鶏豚原料混合肉骨粉 22 検体及び豚蒸製骨粉 1 検体の計 27 検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリング検査を行った。

顕微鏡鑑定により豚肉骨粉中の牛由来組織を検出することは困難であるため、豚肉骨粉等の試験は、ELISA 及び PCR 試験により実施した。

また、豚肉骨粉等には、子豚に給与した代用乳等の牛乳製品等が混入する可能性があることから、豚肉骨粉等の ELISA 試験には、乳製品の影響を受けないメライザキットを用い、PCR 試験では、あらかじめ乳製品等除去処理を行った。

試験の結果は、表 5 に示したように、鶏豚原料混合肉骨粉 1 検体で ELISA 試験で反すう動物由来たん白質が陽性であった。この検体は、PCR 試験では反すう動物由来 DNA が検出されなかったことから、総合判定では反すう動物由来たん白質等不検出と判定された。メライザキットで反すう動物由来たん白質が陽性で PCR で DNA が検出されなかったことについては、加熱加工処理等により DNA が検出限界以下まで分解されたか、あるいは ELISA 非特異反応などが考えられるが、原因は不明であった。

表 5 豚肉骨粉等の試験結果（平成 19 年度）

| 試験方法 | 検出対象 | 試験検体数 | 陽性数 | 陽性率 (%) |
|---------|----------------------------|-------|-----|---------|
| 顕微鏡鑑定 | 獣骨・獣毛 | NT | | |
| ELISA試験 | 反すう動物由来たん白質 ^{注1)} | 27 | 1 | 3.7 |
| PCR試験 | 反すう動物由来DNA | 27 | 0 | 0.0 |
| | | 試験検体数 | 検出数 | 検出率 (%) |
| 総合判定 | 反すう動物由来たん白質・DNA | 27 | 0 | 0.0 |

注 1) メライザキットによる

4) その他の動物質性飼料

魚介類由来たん白質等または家きん由来たん白質を含む混合飼料 8 検体について、ほ乳動物あるいは反すう動物由来たん白質等の試験を行った。これらの内訳は、魚粉を主体とした混合

飼料 5 検体，フィッシュソリュブル吸着飼料 1 検体，魚粉・大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体及びフェザーミール・大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体であった。

試験の結果は，表 2 に示したように，顕微鏡鑑定で肉骨粉等が検出されたものはなかった。また，ELISA 試験及び PCR 試験では乳動物あるいは反すう動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。

3.2 国内製造牛用配混合飼料のモニタリング

平成 19 年度は，189 検体の国内製造牛用配混合飼料について，ほ乳動物由来たん白質等のモニタリング検査を実施した。平成 19 年度は，平成 18 年度と同様に家きん由来たん白質等のモニタリング検査は実施しなかった。

飼料の種類の内訳は，表 6 に示したように，ほ乳期子牛育成用配合飼料 8 検体，幼令牛育成用配合飼料 19 検体，若令牛育成用配合飼料 9 検体，肉用牛肥育用配合飼料 72 検体，乳用牛飼育用配合飼料 51 検体，繁殖用・種牛用配合飼料 13 検体及び牛用混合飼料 17 検体であった。

モニタリングの結果，ほ乳動物由来たん白質等を検出したものはなかった。

表 6 牛用配混合飼料のモニタリング結果（平成 19 年度）

| 飼料の種類 | 試験検体数 | ほ乳動物由来たん白質等 | |
|----------|-------|-------------|---------|
| | | 検出数 | 検出率 (%) |
| 牛用配混合飼料 | | | |
| ほ乳期子牛育成用 | 8 | 0 | 0.0 |
| 幼令牛育成用 | 19 | 0 | 0.0 |
| 若令牛育成用 | 9 | 0 | 0.0 |
| 肉用牛肥育用 | 72 | 0 | 0.0 |
| 乳用牛飼育用 | 51 | 0 | 0.0 |
| 繁殖用・種牛用 | 13 | 0 | 0.0 |
| 牛用混合飼料 | 17 | 0 | 0.0 |
| 合計 | 189 | 0 | 0.0 |

ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングでは，全検体について顕微鏡鑑定（獣骨，獣毛），ELISA 及び PCR 試験を実施した。

モリナガキットによる ELISA 試験及び通常の PCR 試験では，法令上牛用配合飼料への使用が認められている乳製品によって，牛由来たん白質の陽性反応が生ずることから，平成 17 年度から，PCR 試験について乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法（乳製品等除去処理^{2), 4), 17), 18)}を導入した。乳製品が添加されている検体及び通常の PCR 試験では乳動物由来 DNA が検出された検体については，乳製品等除去処理による確認検査を実施し，確認検査の結果陰性であれば不検出と判定している。

試験の結果は，表 7 に示したように，189 検体中顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA 試験では，189 検体のうち 8 検体で牛由来たん白質が陽性であった。

PCR 試験では，189 検体中乳製品等除去処理法による確認検査の結果，ほ乳動物由来 DNA が検出されたものはなかった。これらの検体のうち乳製品が添加された配合飼料は 7 検体であり，乳製品除去処理を実施したものは 14 検体であった。

189 検体のうち PCR 及び ELISA 試験で一致して陽性の検体はなく，総合判定により肉骨粉等

の違反となるほ乳動物由来たん白質等を検出したものはなかった。

表 7 牛用配混合飼料のほ乳動物由来たん白質等の試験結果（平成 19 年度）

| 試験方法 | 検出対象 | 試験検体数 | 陽性数 | 陽性率 (%) |
|---------|------------------------|-------|-----|---------|
| 顕微鏡鑑定 | 獣骨・獣毛 | 189 | 0 | 0.0 |
| ELISA試験 | 牛由来たん白質 ^{注1)} | 189 | 8 | 4.2 |
| PCR試験 | ほ乳動物由来DNA | 189 | 0 | 0.0 |
| | 牛由来DNA | 189 | 0 | 0.0 |
| | 豚由来DNA | 189 | 0 | 0.0 |
| | | 試験検体数 | 検出数 | 検出率 (%) |
| 総合判定 | ほ乳動物由来たん白質・DNA | 189 | 0 | 0.0 |

注 1) モリナガキットによる

3.3 輸入飼料のモニタリング

輸入飼料については、平成 17 年度から重点検査を開始し、平成 17 年度は 35 検体、平成 18 年度は 44 検体のモニタリング検査を実施している。平成 19 年度は、表 8 に示したように、輸入の牛用混合飼料 29 検体、牛用飼料添加物（複合製剤）1 検体及び植物性単体飼料（大豆油かす）1 検体の併せて 31 検体についてモニタリング検査を実施した。

輸入飼料の輸入先国は、表 9 に示したように、アメリカ合衆国が 18 検体と最も多く、ついで台湾が 3 検体、中華人民共和国が 2 検体、大韓民国、シンガポール、イタリア、フランス、スペイン、スイス、ペルー及びオーストラリアが各 1 検体であった。

試験の結果は、表 10 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛等が検出されたものはなかった。モリナガキットによる ELISA 試験では、4 検体で牛由来たん白質が陽性（陽性率 12.9%）であったが、PCR 試験では、乳製品等除去処理による確認試験においてほ乳動物由来 DNA が検出されたものはなく、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等が不検出と判断された。

輸入飼料では、平成 18 年度のモニタリング¹¹⁾においてもモリナガキット陽性率が 27.3%と高く、乳製品の添加又は製造工程内混入によるものと推察された。輸入の牛用混合飼料の場合、配合設計の詳細が不明な場合が多く、製造工程での乳製品の混入の確認も困難であることから、できる限り乳製品の影響を受けない検査手法が望まれる。

そこで、輸入飼料へのメライザキットの適用の可否を調べるため、平成 18 年度から 19 年度に採取した輸入飼料 47 検体（総合判定では乳動物由来たん白質等不検出のもの）を用い、メライザキットによる ELISA 試験を実施した。輸入飼料 47 検体の内訳は、モリナガキット陽性 7 検体、モリナガキット陰性 40 検体であった。

メライザキットによる ELISA 試験の結果は、47 検体ともに反すう動物由来たん白質は検出されず、偽陽性反応も認められなかった。これらの結果から、輸入飼料の検査分析には、モリナガキットより、乳製品の影響を受けないメライザキットを適用することがよいと判断され、平成 20 年度以降のモニタリングには、メライザキットを用いることとした。

表 8 輸入飼料のモニタリング結果（平成 19 年度）

| 輸入飼料の区分 | 飼料の種類等 | 試験検体数 | ほ乳動物由来たん白質等 | |
|---------|--------|-------|-------------|---------|
| | | | 検出数 | 検出率 (%) |
| 配混合飼料 | 牛用混合飼料 | 29 | 0 | 0.0 |
| 飼料添加物 | 牛用複合製剤 | 1 | 0 | 0.0 |
| 植物性単体飼料 | 大豆油かす | 1 | 0 | 0.0 |
| 合 計 | | 31 | 0 | 0.0 |

表 9 輸入飼料の輸入先国（平成 19 年度）

| 輸入先国 | 試験検体数 | | | |
|---------|-------|--------|-------|---------|
| | 合計 | 牛用混合飼料 | 飼料添加物 | 植物性単体飼料 |
| アメリカ合衆国 | 18 | 16 | 1 | 1 |
| 台湾 | 3 | 3 | | |
| 中華人民共和国 | 2 | 2 | | |
| 大韓民国 | 1 | 1 | | |
| シンガポール | 1 | 1 | | |
| イタリア | 1 | 1 | | |
| フランス | 1 | 1 | | |
| スペイン | 1 | 1 | | |
| スイス | 1 | 1 | | |
| オーストラリア | 1 | 1 | | |
| ペルー | 1 | 1 | | |
| 合 計 | 31 | 29 | 1 | 1 |

表 10 輸入飼料の試験結果（平成 19 年度）

| 試験方法 | 検 出 対 象 | 試験検体数 | 陽性数 | 陽性率 (%) |
|---------|----------------------------|-------|-----|---------|
| 顕微鏡鑑定 | 獣骨・獣毛 | 31 | 0 | 0.0 |
| ELISA試験 | 反すう動物由来たん白質 ^{注1)} | 31 | 0 | 0.0 |
| | 牛由来たん白質 ^{注2)} | 31 | 4 | 12.9 |
| PCR試験 | ほ乳動物由来DNA | 31 | 0 | 0.0 |
| | 牛由来DNA | 31 | 0 | 0.0 |
| 総合判定 | ほ乳動物由来たん白質・DNA | 試験検体数 | 検出数 | 検出率 (%) |
| | | 31 | 0 | 0.0 |

注 1) メライザキットによる

2) モリナガキットによる

4 まとめ

BSE（牛海綿状脳症）の発生防止対策の一環として、平成 19 年度に採取した動物質性飼料 198 検体、国内牛用配混合飼料 189 検体及び輸入飼料 31 検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験により動物由来たん白質等のモニタリング検査を実施した結果は、次のとおりであった。

1) チキンミール 31 検体、フェザーミール 18 検体及び豚血粉 1 検体の計 50 検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は、すべての検体で、顕微鏡鑑定、ELISA

及びPCR試験とも陰性であり，反すう動物由来たん白質等は検出されなかった。

- 2) 国内製造魚粉等 110 検体及び輸入魚粉 3 検体について，ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は，国内魚粉 1 検体で ELISA 試験が陽性であったが，乳製品除去処理による PCR では陰性であり，総合判定によりすべての検体でほ乳動物由来たん白質等は検出されなかった。
- 3) 豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉 27 検体について，反すう動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は，鶏豚原料混合肉骨粉 1 検体で ELISA 試験で陽性であったが，乳製品等除去処理による PCR では不検出であり，総合判定で反すう動物由来たん白質を検出したものはなかった。
- 4) 国内製造の牛用配混合飼料 189 検体について，ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は，ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。モリナガキットによる ELISA 試験では，8 検体で牛由来たん白質が陽性であったが，乳製品等除去処理による PCR を実施した結果は，いずれも牛由来 DNA が検出されず，これらは，法令上牛用飼料への使用が認められている乳製品の添加または混入によるものと推察された。
- 5) 輸入の牛用混合飼料 29 検体及び牛用飼料添加物 1 検体及び大豆油かす 1 検体について，ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果，モリナガキットでは 4 検体で ELISA 試験が陽性であったが，乳製品等除去処理 PCR を実施した結果は，ELISA 陽性検体を含めほ乳動物由来 DNA は検出されず，総合的に不検出と判定された。
- 6) 輸入飼料（牛用混合飼料）47 検体を用い，メライザキットによる ELISA 試験を実施した結果，輸入飼料（牛用混合飼料）の検査分析には，メライザキットを適用することが適当であると判断された。

文 献

<分析法通知関係>

- 1) 農林水産省生産局長通知：“反すう動物用飼料への反すう動物由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について”，平成 13 年 6 月 1 日，13 生畜第 1366 号 (2001).
- 2) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検査法について”，平成 14 年 4 月 9 日，14 生畜第 181 号 (2002).
最終改正 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検査法について」の改正について”，平成 18 年 3 月 17 日，17 消安第 12305 号 (2006).
廃止 平成 20 年 4 月 1 日付で飼料分析基準⁴⁾に収載され，本通知は廃止された。
- 3) 飼料分析基準研究会編：“飼料分析法・解説”第 18 章 動物由来たん白質・DNA（社団法人日本科学飼料協会発行）(2004).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号(2008).
- 5) 農林水産省畜産局長通知：“飼料等検査実施要領の制定について”，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).

<動物由来たん白質のモニタリング関係>

- 6) 草間 豊子，日比野 洋，野村 哲也，石橋 隆幸：飼料研究報告，29，244 (2004).

- 7) 草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 風間 鈴子, 関口 好浩, 西村 真由美, 内山 丈, 古川 明, 中村 行伸, 小森谷 敏一, 堀切 正賀寿, 三井 (小宮) 友紀子, 千原 哲夫, 青山 恵介, 井上 智江, 下村 正之, 鬼頭 敦司, 松崎 学, 牧野 大作, 松崎 美由紀 : 飼料研究報告, **29**, 252 (2004).
 - 8) 草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 関口 好浩, 西村 真由美, 山本 克己, 遠藤 剛, 石田 有希恵, 福中 理絵, 小森谷 敏一, 堀切 正賀寿, 三井 友紀子, 中村 志野, 井上 智江, 吉田 知太郎, 鬼頭 敦司, 松崎 学, 屋方 光則, 牧野大作, 林 美紀子, 松崎 美由紀, 児玉 恭子 : 飼料研究報告, **30**, 138 (2005).
 - 9) 草間 豊子, 日比野 洋, 野村 哲也, 野口 淳, 遠藤 剛, 西村 真由美, 高橋 亜紀子, 白澤 優子, 山本 克己, 福中 理絵, 森 有希子, 下村 正之, 小森谷 敏一, 堀切 正賀寿, 三井 友紀子, 牧野 大作, 吉田 知太郎, 鬼頭 敦司, 荒木 誠士, 屋方 光則, 林 美紀子, 永原 貴子, 松崎 美由紀, 児玉 恭子 : 飼料研究報告, **31**, 228 (2006).
 - 10) 草間 豊子 : 飼料研究報告, **32**, 203 (2007).
 - 11) 草間 豊子 : 飼料研究報告, **33**, 165(2008).
 - 12) T. Kusama, H. Hibino, T. Onodera, and K. Sugiura: *Veterinaria Italiana*, **45** (2) (2008) (in press).
- <PCR 試験法関係>
- 13) T. Kusama, T. Nomura, and K. Kadowaki: *J. Food Protection*, **67** (6), 1289 (2004).
 - 14) 野村 哲也, 草間 豊子, 門脇 光一 : 食品衛生学雑誌, **47** (5), 222 (2006).
 - 15) 野村 哲也, 草間 豊子 : 飼料研究報告, **30**, 52 (2005).
 - 16) 草間 豊子, 野村 哲也 : 飼料研究報告, **30**, 60 (2005).
 - 17) 草間 豊子 : 飼料研究報告, **30**, 79 (2005).
 - 18) 草間 豊子, 関口 好浩 : 飼料研究報告, **31**, 147 (2006).
 - 19) 篠田 直樹, 吉田 知太郎, 草間 豊子 : 飼料研究報告, **33**, 122 (2008).
 - 20) N. Shinoda, T. Kusama, T.Yoshida, T.Sugiura, K. Kadowaki, T. Onodera, and K. Sugiura: *J. Food Protection*, **71** (11), 2257 (2008).
 - 21) 吉田 知太郎, 野村 哲也, 篠田 直樹, 草間 豊子, 門脇 光一, 杉浦 勝明 : 食品衛生学雑誌, **50**, 89 (2009).
- <ELISA 試験法関係>
- 22) 日比野 洋 : 飼料研究報告, **29**, 181 (2004).
 - 23) 日比野 洋 : 飼料研究報告, **31**, 155 (2006).
 - 24) 関口 好浩, 草間 豊子 : 飼料研究報告, **33**, 78 (2008).