

**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18年度）**

草間 豊子\*

**A Monitoring of Animal Protein Contamination in Feeds  
as a Measure to Prevent BSE in Japan (2006)**

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 2006, the FAMIC analyzed 185 samples of domestic feeds for cattle, 44 samples of imported feeds for cattle and 199 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, 23 samples of feather meal or 107 samples of fish meal was contaminated with mammalian protein. One (3.7%) of 27 samples of meat-and-bone meal of pork-origin and pork-and-chicken-origin was positive for ruminant protein. After cleaning of the manufacturing plant was conducted, feed products were sampled and analyzed with negative results. Two commercially available ELISA kits: Morinaga ELISA kit against a heat-treated bovine protein (Morinaga Institute of Biological Science, Inc.); and MELISA-TEK RUMINAT KIT for meat-and-bone meal and animal feed (ELISA Technologies, Inc.) were tested using 32 samples of chicken meal and feather meal. MELISA-TEK produced better results.

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

---

\* 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

## 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<sup>1)</sup>を補完する手法としてPCR法<sup>11)~16)</sup>及びELISA法<sup>17)~20)</sup>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<sup>2)~4)</sup>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。

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<sup>6)~10)</sup>してきた。

平成18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<sup>2), 4)</sup>に記載されたことから、豚肉骨粉等の検査に適用するとともに、チキンミールやフェザーミールへの適用の可否についても検討を行った。

今回、平成18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18年4月から平成19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（当時独立行政法人肥飼料検査所）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199検体、国内製造牛用配混合飼料185検体及び輸入牛用飼料44検体の計428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及びフェザーミール（以下「チキンミール等」という。）、豚由来肉骨粉及び原料混合肉骨粉（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養魚用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、牛用配混合飼料及び牛用（A飼料）単体飼料（加熱加工等処理を行った包装品）を採取した。

試料の採取は、飼料等検査実施要領<sup>5)</sup>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500g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。

### 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」<sup>1)</sup>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。

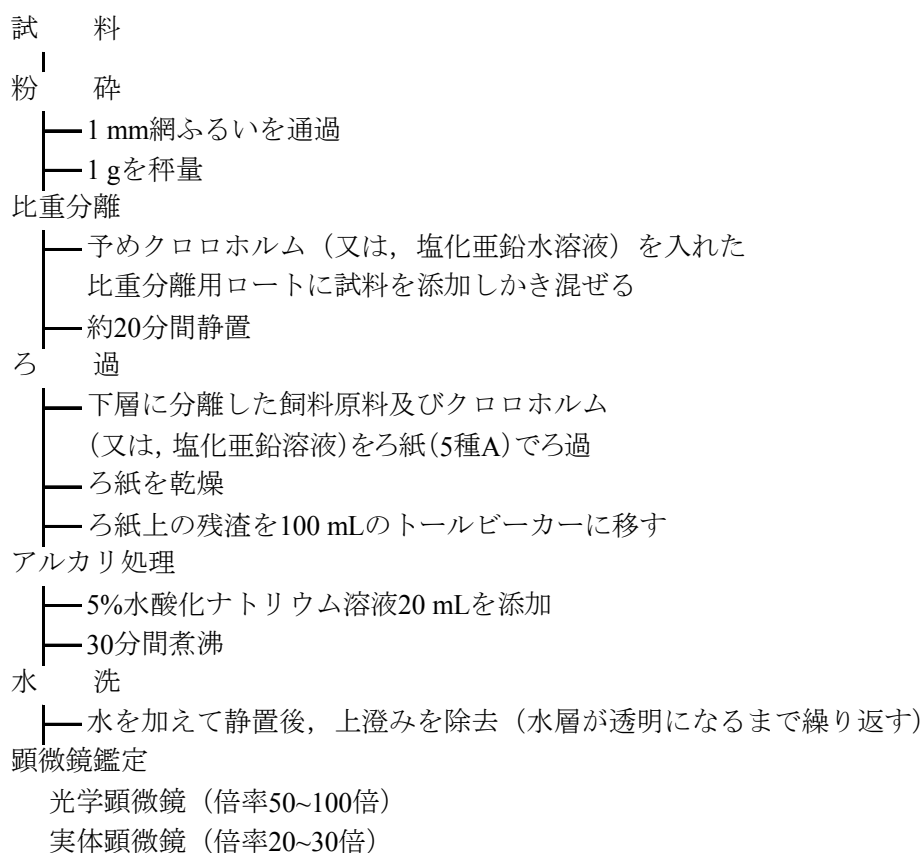


図1 飼料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

### 2) ELISA 試験

「ELISAによる飼料中の動物由来たん白質の検出法」<sup>2)~4)</sup>に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及びチキンミール等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、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、チキンミール等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18年度は、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点の結果が一致しない場合には、再試験を実施し、再試験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。

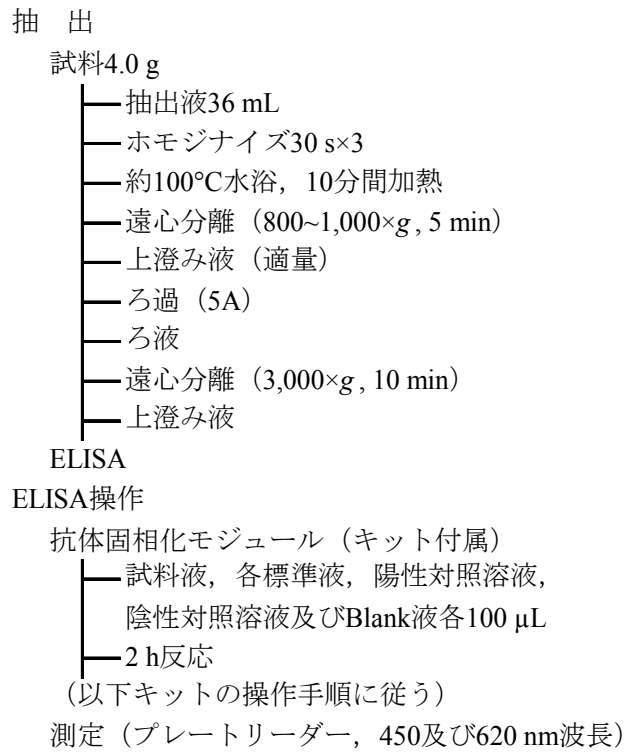


図 2-1 「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」による試験方法

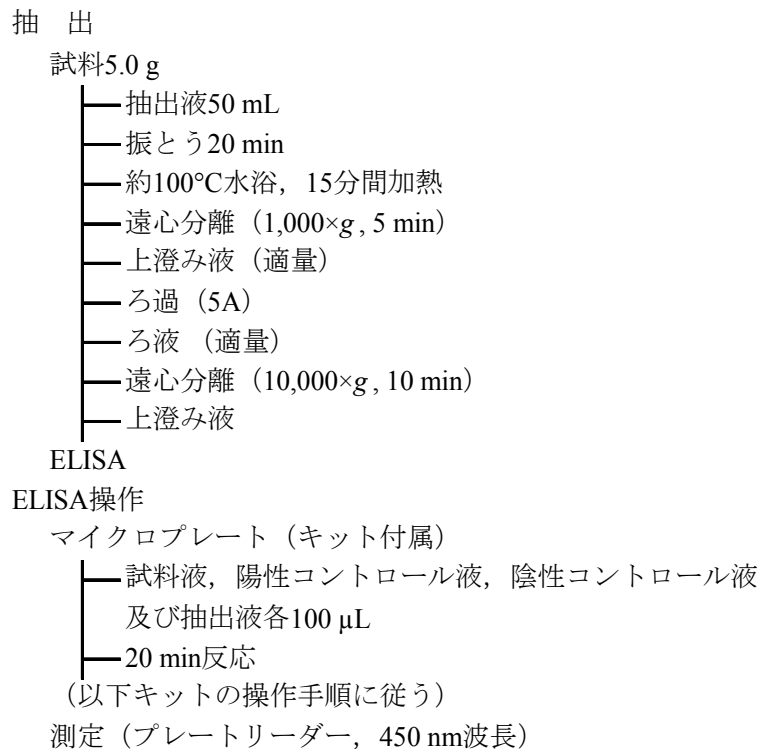


図 2-2 「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」による試験方法

### 3) PCR 試験

「PCRによる飼料中の動物由来DNAの検出法」<sup>2)-4)</sup>に基づき、豚肉骨粉等以外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。）<sup>2), 4), 15), 16)</sup>を行った。

なお、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の検出を、魚粉等については魚類由来DNAの検出<sup>12)</sup>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<sup>13)</sup>を、豚肉骨粉についてはほ乳動物又は豚由来DNAの検出等を行い、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]（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、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。

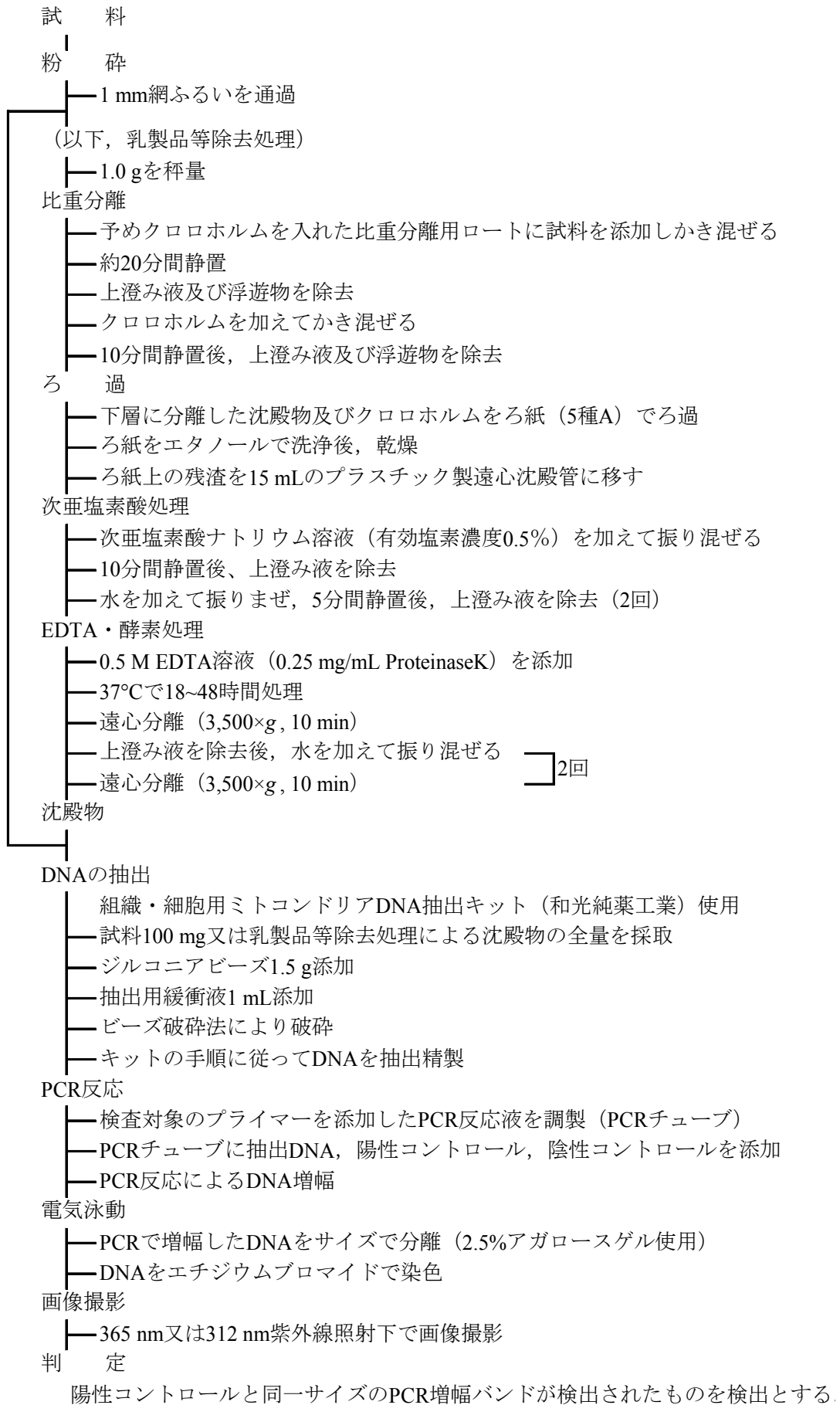


図3 PCR法による動物由来DNAの検出方法

#### 4) 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 試験の結果陽性であっ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 199 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。199 検体の試料の内訳は、チキンミール等 54 検体、魚粉等 107 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 11 検体であった。

これらのモニタリング集計結果は、表 1 に示したとおりであり、動物質性飼料 199 検体のうち、ほ乳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たが、平成 18 年度からは、BSE 発生リスクの高い反すう動物由来たん白質について重点的にモニタリングを行うこととした。

表1 動物質性飼料のモニタリング結果 (平成18年度)

動物質性 飼料の区分	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 (%)
チキンミール等	チキンミール	31	0	0.0
	フェザーミール	23	0	0.0
	小計	54	0	0.0
魚粉等 (内訳)	国内製造魚粉等	107	0	0.0
	魚粉・魚アラ粕	(92)		
	だし粕	(4)		
	イカミール	(3)		
	カニ殻	(2)		
	魚鱗コラーゲン	(1)		
	貝ミール	(1)		
	酵素処理魚抽出物	(3)		
	フィッシュソリュブル	(1)		
	小計	107	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	23	1	4.3
	小計	27	1	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
	加水分解たん白質 (ペットフード用)	3	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	11	0	0.0
合計		199	1	0.5

## 1) チキンミール等

チキンミール 31 検体及びフェザーミール 23 検体の計 54 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。平成 18 年度は、血粉及び発酵血粉の採取はなかった。

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。

試験の結果は、表 2-1 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。モリナガキットによる ELISA 試験では、牛由来たん白質が 9 検体 (フェザーミール 7 検体、チキンミール 2 検体) で陽性であり、陽性率は 16.7%であった。

ELISA 陽性の検体を含むすべての試料について、PCR によりほ乳動物由来 DNA の試験を行った結果は、いずれもほ乳動物由来 DNA が検出されなかった。したがって、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等不検出と判定された。

モリナガキットによる ELISA 試験において多数の陽性が確認されたことから、この原因について調べるため、平成 18 年 8 月までに採取したチキンミール 17 検体及びフェザーミール 15 検体の計 32 検体について、メライザキットを用いて ELISA 試験を実施し、モリナガキットの結果と比較した。

試験の結果は、表 2-2 及び 2-3 に示したように、モリナガキット陽性の 9 検体を含むすべての



試料でメライザキットでは、反すう動物由来たん白質を検出しなかった。メライザキットは、反すう動物由来の肉骨粉など骨格筋を特異的に検出し、他の動植物由来たん白質や乳等組織には反応しない<sup>20)</sup>ことから、平成18年度のモリナガキット陽性検体には、牛肉骨粉の混入はないものと判断された。

これらの結果から、チキンミール等のELISA試験には、モリナガキットよりメライザキットを適用することがよいと考えられたことから、平成19年度以降のモニタリングにおいては、メライザキットを用いることとした。

表 2-1 チキンミール等の試験結果（平成18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	54	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	54	9	16.7
	反すう動物由来たん白質 <sup>注2)</sup>	54	0	0.0
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	54	0	0.0
	牛由来DNA	54	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	54	0	0.0
	牛由来たん白質・DNA	54	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

2) メライザキットによる

表 2-2 メライザキットとモリナガキットの比較（チキンミール）

(n=2)

チキンミール 試料No.	メライザキット (Blank補正済み)		モリナガキット		顕微鏡鑑定 獣骨・獣毛	PCR試験 ほ乳動物由来 DNA		
	判定 <sup>注1)</sup>	Sample (O.D.)	NC (O.D.)	判定 <sup>注2)</sup>			Sample (O.D.)	NC (O.D.)
C1	-	-0.005	0.002	-	0.082	0.049	-	-
C2	-	-0.001	0.014	-	0.058	0.066	-	-
C3	-	-0.001	0.014	-	0.044	0.033	-	-
C4	-	-0.016	-0.001	-	0.045	0.033	-	-
C5	-	-0.013	-0.001	+	0.185	0.041	-	-
C6	-	-0.013	0.006	-	0.059	0.050	-	-
C7	-	-0.010	0.006	-	0.105	0.073	-	-
C8	-	-0.008	0.006	-	0.119	0.073	-	-
C9	-	0.036	0.006	-	0.075	0.043	-	-
C10	-	-0.004	0.006	-	0.048	0.043	-	-
C11	-	0.002	0.002	-	0.091	0.050	-	-
C12	-	-0.010	0.002	-	0.050	0.041	-	-
C13	-	-0.015	0.002	-	0.063	0.041	-	-
C14	-	0.026	0.002	+	0.138	0.050	-	-
C15	-	-0.007	0.002	-	0.067	0.052	-	-
C16	-	0.000	0.002	-	0.063	0.041	-	-
C17	-	0.003	0.013	-	0.030	0.034	-	-
陽性/試料	0/17			2/17			0/17	0/17

注 1) Sample (O.D.)が 0.100 以上の場合に+と判定

2) Sample (O.D.)が, NC (O.D.)の 2 倍以上であった場合に+と判定

表 2-3 メライザキットとモリナガキットの比較 (フェザーミール) (n=2)

フェザーミール 試料No.	メライザキット (Blank補正済み)		モリナガキット		顕微鏡鑑定 獣骨・獣毛	PCR試験 ほ乳動物由来 DNA		
	判定 <sup>注1)</sup>	Sample (O.D.)	NC (O.D.)	判定 <sup>注2)</sup>			Sample (O.D.)	NC (O.D.)
F1	-	-0.004	0.002	+	0.093	0.032	-	-
F2	-	-0.016	-0.001	-	0.050	0.033	-	-
F3	-	-0.012	-0.001	-	0.062	0.033	-	-
F4	-	-0.009	-0.001	+	0.068	0.033	-	-
F5	-	-0.007	0.004	-	0.062	0.040	-	-
F6	-	-0.013	0.004	+	0.210	0.073	-	-
F7	-	-0.003	0.004	+	0.153	0.073	-	-
F8	-	-0.005	0.004	+	0.158	0.073	-	-
F9	-	-0.004	0.004	-	0.137	0.073	-	-
F10	-	-0.010	0.002	+	0.111	0.050	-	-
F11	-	-0.004	0.002	+	0.096	0.041	-	-
F12	-	-0.001	0.002	-	0.056	0.041	-	-
F13	-	0.004	0.013	-	0.053	0.034	-	-
F14	-	0.021	0.013	-	0.064	0.038	-	-
F15	-	0.002	0.005	-	0.056	0.037	-	-
陽性/試料	0/15			7/15			0/15	0/15

注 1) Sample (O.D.)が 0.100 以上の場合に+と判定

2) Sample (O.D.)が, NC (O.D.)の 2 倍以上であった場合に+と判定

## 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 107 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 1 のとおり、魚粉・魚アラ粕 92 検体、だし粕 4 検体、イカミール 3 検体、カニ殻 2 検体、魚鱗コラーゲン 1 検体、貝ミール 1 検体、酵素処理魚抽出物 1 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 18 年度は採取しなかった。

ほ乳動物由来たん白質等の試験の結果は、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。ELISA 試験では牛由来たん白質が 1 検体で陽性であったが、PCR 試験ではほ乳動物由来 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を不検出と判定された。

なお、平成 17 年度のモニタリングにおいて、ELISA 及び PCR 試験で多数の魚粉等からほ乳動物由来たん白質等が検出された<sup>10)</sup>ことから、この原因を確認するため、水産練り製品等について ELISA 及び PCR 試験による調査を実施した。調査の結果は、魚肉ソーセージ、チーズ入り蒲鉾及びみりん干しからはほ乳動物由来たん白質・DNA が検出され、ちくわ、魚肉すり身及びさつま揚げからは検出されなかった。また、乳製品等除去処理 PCR ではいずれもほ乳動物由来 DNA が検出されなかった。したがって、魚粉等の陽性事例は、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。魚粉への食品残渣の利用は認められていないが、水産加工残渣の飼料への有効利用を推進するため、乳製品等の混入事例について、違反処理す

ることのないよう、平成18年度は、魚粉等の検査にあたり、PCR陽性検体について乳製品等除去処理PCRによる確認試験を実施することとした。

表3 魚粉等の試験結果（平成18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	107	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	107	1	0.9
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	107	0	0.0
	牛由来DNA	107	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	107	0	0.0
	牛由来たん白質・DNA	107	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を実施<sup>10)</sup>している。

平成18年度は、表1に示したように豚肉骨粉4検体及び鶏豚原料混合肉骨粉23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、ELISA試験は、当初「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」により実施したところ、多数の豚肉骨粉検体で陽性反応が見られた。この原因として、子豚に給与した代用乳等の乳製品等が豚肉骨粉中に混入したためと考えられたことから、豚肉骨粉等のELISA試験には、乳製品の影響を受けないELISAキット「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット反すう動物用」を導入し、試験を実施した。PCR試験は、乳製品等除去処理法を実施した。

試験の結果は、表4に示したように、原料混合肉骨粉1検体でELISA及びPCR試験で反すう動物由来たん白質及び反すう動物由来DNAを検出し、総合判定で反すう動物由来たん白質等検出と判定された。この検体は、事業場の農林水産大臣確認前の調査試料であり、反すう動物由来たん白質等が検出されたことから、工程の洗浄クリーニングを実施した後に、再度試料を採取して確認した結果は、反すう動物由来たん白質は検出されなかった。

表 4 豚肉骨粉等の試験結果 (平成 18 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 <sup>注1)</sup>	27	1	3.7
PCR試験	反すう動物由来DNA	27	1	3.7
	牛由来DNA	27	1	3.7
		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	1	3.7
(内訳)	牛由来たん白質・DNA	8	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

1)~3)以外に、魚介類由来たん白質等の動物性飼料を含むかあるいは含む可能性のある飼料 11 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、フェザーミール大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体及び加水分解たん白質 (豚及び鶏由来) 3 検体であった。

試験の結果は、表 1 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 試験ではほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。

なお、一部の発酵飼料において、コントロール試験の魚類由来 DNA が検出されなかったが、製造過程において魚類由来 DNA が分解されたものと考えられた。

### 3.2 国内製造牛用配混合飼料のモニタリング

平成 18 年度は、185 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を実施した。平成 18 年度は、家きん由来たん白質等のモニタリングは実施しなかった。

飼料の種類の内訳は、表 5 に示したように、ほ乳期子牛育成用配合飼料 6 検体、幼令牛育成用配合飼料 16 検体、若令牛育成用配合飼料 14 検体、肉用牛肥育用配合飼料 65 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 12 検体及び牛用混合飼料 21 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 5 牛用配混合飼料のモニタリング結果 (平成 18 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	6	0	0.0
幼令牛育成用	16	0	0.0
若令牛育成用	14	0	0.0
肉用牛肥育用	65	0	0.0
乳用牛飼育用	51	0	0.0
繁殖用・種牛用	12	0	0.0
混合飼料	21	0	0.0
合計	185	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。

「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」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陽性反応が生ずる可能性があることから、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）<sup>2), 4), 15), 16)</sup>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た。

試験の結果は、表 6 に示したように、185 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、185 検体のうち 12 検体で牛由来たん白質が陽性であった。

PCR 試験では、185 検体中 2 検体では乳動物由来 DNA が検出されたが、牛由来 DNA 又は豚由来 DNA が検出されたものはなかった。このうち乳製品が添加された配合飼料は 5 検体であり、乳製品除去処理を実施したものは 19 検体であった。

185 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 6 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 18 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	185	0	0.0
ELISA 試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	185	12	6.5
PCR 試験	ほ乳動物由来 DNA	185	2	1.1
	牛由来 DNA	185	0	0.0
	豚由来 DNA	185	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	185	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 18 年度は輸入の牛用混合飼料及び植物性単体飼料についてモニタリングを実施した。

試料は、表 7 に示したように、牛用配混合飼料 36 検体、牛用飼料添加物 2 検体及び植物性単体飼料 6 検体の併せて 44 検体であった。

輸入飼料の輸入先国は、表 8 に示したように、アメリカ合衆国が 23 検体と最も多く、ついで中華人民共和国が 5 検体、カナダ及び英国が各 3 検体、台湾及びタイが各 2 検体、大韓民国、フランス、シンガポール、アイルランド、スイス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 9 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。ELISA 試験では、牛由来たん白質が 4 検体で陽性であり、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 が検出されたものが 2 検体あったが、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。

表7 輸入飼料のモニタリング結果（平成18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	牛等用混合飼料	36	0	0.0
飼料添加物	牛用飼料添加物	2	0	0.0
植物性単体飼料	甘草抽出物	1	0	0.0
	コーンコブミール	1	0	0.0
	雑穀酒かす	1	0	0.0
	大豆油かす	1	0	0.0
	バガス	1	0	0.0
	ビール粕	1	0	0.0
	小計	6	0	0.0
合計		44	0	0.0

表8 輸入飼料の輸入先国（平成18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	23	20	2	1
中華人民共和国	5	2		3
英国	3	3		
カナダ	3	3		
台湾	2	2		
タイ	2	0		2
大韓民国	1	1		
フランス	1	1		
シンガポール	1	1		
アイルランド	1	1		
スイス	1	1		
オーストラリア	1	1		
合計	44	36	2	6

表9 輸入飼料のモニタリング結果（平成18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	44	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	44	12	27.3
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	44	2	4.5
	牛由来DNA	44	0	0.0
	豚由来DNA	44	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	44	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

#### 4 まとめ

牛海綿状脳症の発生防止対策の一環として、平成18年度に採取した動物質性飼料199検体、国内牛用配混合飼料185検体及び輸入飼料44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検体及びフェザーミール23検体の計54検体について、ほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果は、ELISA試験で陽性のものが9検体あったが、PCR試験の結果はすべてほ乳動物由来DNAが検出されず、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等が不検出であった。
- 2) チキンミール17検体及びフェザーミール15検体を用いて、モリナガキットとメライザキットの試験結果を比較したところ、これらの試料にはメライザキットを適用するのが適当であると判断された。
- 3) 国内製造魚粉等107検体についてはほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。
- 4) 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検体で反すう動物由来たん白質等が検出された。製造事業場の工程の洗浄クリーニングを実施した後に再度検体を採取し検査したところ、反すう動物由来たん白質は検出されなかった。
- 5) 国内製造の牛用配混合飼料185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。ELISA試験では、12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が検出されたものはなく、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混入等によるものと推察された。
- 6) 輸入の牛用混合飼料36検体及び牛用飼料添加物2検体及び植物性単体飼料6検体について、ほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果、12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及びPCR試験で一致して陽性のものはなく、総合的に不検出と判定された。

#### 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）。

（（独）農林水産消費安全技術センターホームページ（飼料関係／分析法）：

<http://www.ffis.famic.go.jp/>）

廃止 平成20年4月1日付で飼料分析基準<sup>4)</sup>に記載され、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).

<PCR 試験法関係>

11) T. Kusama, T. Nomura, and K. Kadowaki: J. Food Protection, 67 (6), 1289 (2004).

12) 野村哲也，草間豊子，門脇光一：食品衛生学雑誌，47 (5)，222 (2006).

13) 野村哲也，草間豊子：飼料研究報告，30，52 (2005).

14) 草間豊子，野村哲也：飼料研究報告，30，60 (2005).

15) 草間豊子：飼料研究報告，30，79 (2005).

16) 草間豊子，関口好浩：飼料研究報告，31，147 (2006).

<ELISA 試験法関係>

17) 日比野 洋：飼料研究報告，29，181 (2004).

18) 日比野 洋：飼料研究報告，31，155 (2006).

19) 関口好浩，草間豊子：（社）日本食品衛生学会第 92 回学術講演会講演要旨集，83 (2006).

20) 関口好浩，草間豊子：飼料研究報告，32，78 (2008).