

4-(3) 第17回BSE技術検討会提出資料及び概要

アルカリ処理された有機入り液状肥料の出荷の一時停止措置の解除について

平成15年6月13日
生産局生産資材課

1. BSE技術検討会における検討経緯

- 第14回及び第16回検討会において本件について検討をお願いし、以下のとおりご意見・ご指摘をいただいたところ。

第14回(15年1月29日)

WHOのガイドラインを満たす不活性化処理がされているとの根拠だけでは不十分。アルカリ処理により異常プリオンがアミノ酸にまで分解されていることについて、データを示すことが必要

第16回(15年4月8日)

アミノ酸まで分解されなかった部分に感染性が残る可能性が否定できない。

分子量データも示されたが、分子量1万以上のデータがなく不十分。

スパイクングによるバリデーション等で、アルカリ処理により異常プリオンが実際に不活性化されていること(10^{-6} 程度の除去効率があること)を示すことが必要。

- 第16回検討会のご指摘を受け、アルカリ処理された液状肥料のBSEに関する安全性評価試験を(独)動物衛生研究所に依頼して実施。

2. 安全性評価試験の結果

別紙3の試験報告のとおり、マウス脳由来の異常プリオンたん白質を添加した肉粕(液状肥料の原料)について、液状肥料製造工程に即したアルカリ処理を行い、処理後の異常プリオンたん白質をウエスタンブロット法により検出する方法により、異常プリオンの不活性化の程度を調べた。

その結果、アルカリ処理により異常プリオンが $1/10^6$ 以下に減少していることが確認された。

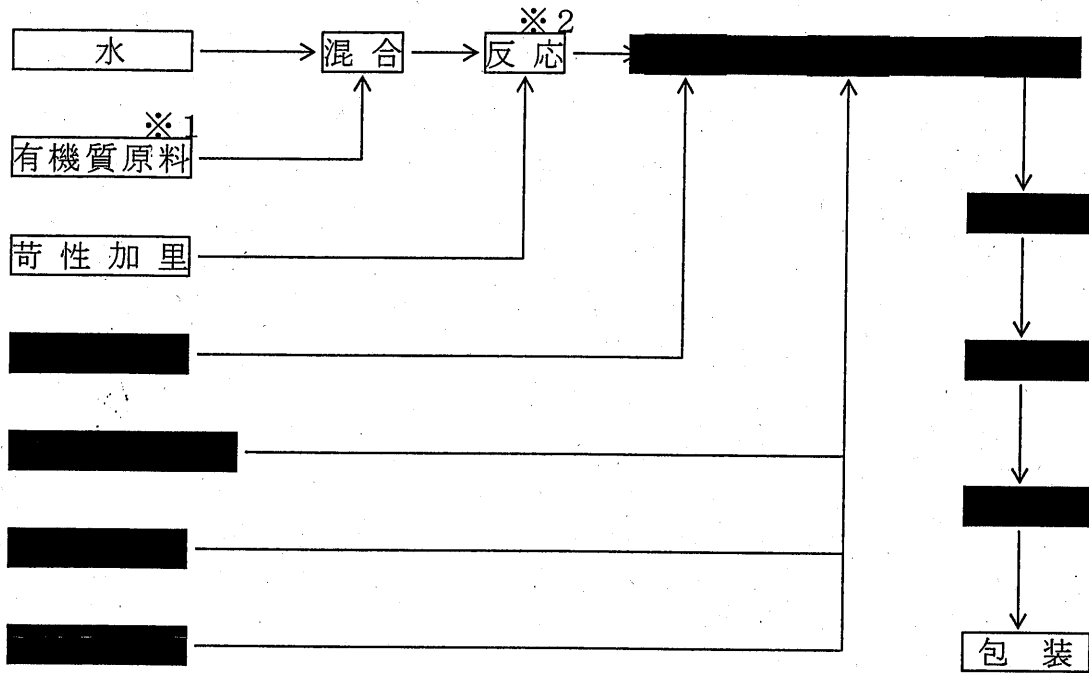
3. アルカリ処理された有機入り液状肥料の今後の取扱い

本検討会で、上記試験による結果を評価いただき、当該肥料がBSEに関しては安全であることとされれば、下記条件を付した上で、平成13年10月4日から継続されている出荷等の一時停止措置の解除を行うこととしたい。

- ・放牧地での施用禁止
- ・動物性たん白が含まれている旨の表示の義務づけ

(別紙 1)

有機入り液状肥料の生産工程の例



※1 有機質原料は、動物質原料(肉かすあるいはゼラチン)の他、植物質原料も使用。製品中の動物質原料の含有率は■■■■%で、■■■■%もののが大半。

※2 肉かすが原料の場合、反応は水を加えて5.59モル濃度となった苛性加里溶液中で85℃、1時間以上。(水■■kg、苛性加里(8.57モル濃度)■■kg)

有機質原料も加えた反応液のモル濃度は、

$$\text{■■kg (苛性加里の投入量)} \times 8.57 \text{mol/kg (苛性加里の重量モル濃度)} \div \text{■■kg (苛性加里に水、有機質原料を加えた反応液の総重量)} \times 1.2 \text{kg/L (反応液の比重)} = \underline{2.32 \text{ mol/L}}$$

(別紙 2)

有機入り液状肥料製造工程におけるアルカリ処理の方法

動物性原料	アルカリ原料	処理液モル濃度	処理時間
肉かす	KOH	5.59	1 時間以上
ゼラチン	■	■	〃
ゼラチン分解液	■	■	〃

液状肥料原料の製造工程

肉かす

牛皮周辺の毛・肉・脂

↓
蒸製加工(約 135 °C・2 時間の熱処理)

↓
■

↓
■

↓
■

→ 肉かす原料

ゼラチン

牛 骨

(H12.12.12 付け厚生省医薬安全局長通知 医薬発第 1226 号に即し、BSE 発生) のリスクが低い国から輸入されたもので、危険部位が除かれたもの

↓
粉碎・脱脂・乾燥

↓
塩酸等の強酸で処理(3 ~ 6%塩酸に 5 ~ 7 日浸漬。pH1.5 以下)し脱灰

↓
消石灰でアルカリ処理(1 ~ 5%石灰水中に 2 ~ 3 か月浸漬。pH12.5 以上)

↓
水洗・中和後、50 ~ 100 °Cの温水中でゼラチンを抽出

↓
ろ 過

↓
減圧下で低温(70 ~ 100 °C)濃縮

↓
高温・短期間殺菌(138 °C以上、4 秒以上)

↓
乾燥後、製品化 → カプセル製剤材料として医薬品・健康食品に利用
製剤打ち抜き後のネットを肥料原料として利用

ゼラチン分解液

ゼラチン打ち抜きネット

↓
■

溶解

↓
ゼラチン分解液

(別紙3)

肉粕液中に混入したプリオンの KOH 処理による不活化

動物衛生研究所 プリオン病研究センター 横山 隆

一部の液体肥料にはアルカリ処理により溶解した牛由来のくず肉(肉粕)が用いられていた。牛海綿状脳症(BSE)の発生に伴って、肉粕を原材料とした肥料の製造は取りやめられている。プリオンの不活化方法の一つに 1~2N の水酸化ナトリウム処理(NaOH)が推奨されている。しかし、これは実験器具などの不活化法として提案されており、液体肥料の製造工程の様な高濃度の夾雑物(蛋白質)が混入した場合のプリオン不活化の程度については不明である。従って、BSE 発生以前の製品(在庫)については、その処分が保留されていた。液体肥料の製造工程に伴うプリオンの不活化の程度を調べる目的で、マウス継代スクレイピープリオンに KOH 処理を行い、ウエスタンブロット法による異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の検出を指標としてプリオンの不活化の程度を評価した。

マウスで継代したスクレイピープリオン帯広株を脳内接種し、発症した ICR 系マウスの脳を使用した。実際の製造工程でアルカリ処理の後、中和(塩酸を使用)した肉粕液を対照として使用した。

1) 肉粕液へのプリオンスパイクテスト(図1)

中和処理した肉粕液(pH試験紙にて pH6~7)にスクレイピー感染マウス脳乳剤をスパイクした各試料からの PrP^{Sc}の回収を試みた。肉粕液でスクレイピー感染マウス脳ホモジネートを段階希釈(10⁻¹~10⁻⁶)した。各サンプルをサルコシルで抽出後、上清中の PrP^{Sc}をリンダングステン酸で沈殿させた。ウエスタンブロット法で PrP^{Sc}の検出を行ったところ感染マウス脳 0.5 μg 当量の PrP^{Sc}まで検出することが可能であった。脳乳剤はプロテイナーゼ K 未処理の状態でスパイクし、プリオン蛋白質(1/10 程度の正常プリオン蛋白質を含む)の総量として検出している。

2) KOH 処理した感染マウス脳からの PrP^{Sc}の検出(図2,3)

実際の液体肥料の製造工程に準じて、感染マウス脳 0.5g, 肉粕 0.14g, KOH (48%(W/V)) 157 μL, DW100 μL を加えて 85°C 1時間処理した。処理後のサンプルは塩酸で中和後、1) のスパイクテストと同様に PrP^{Sc}の精製を試みた。ペレットをウエスタンブロット法で解析したが、70mg 当量のサンプルからは PrP^{Sc}のシグナルは検出できなかった(図2)。100mg 当量のサンプルからの PrP^{Sc}の検出でも特異的なシグナルは検出されなかった(図3)。なお、図2, 図3の結果はそれぞれ個別に行った KOH 処理試験の結果を示している。

1), 2)の結果より、今回の検出系では感染脳重量 $0.5 \mu\text{g}$ 相当の PrP^{Sc} の検出が可能であった。被検試料には 70, 100 mg 分の感染脳が含まれており、それらが陰性であったことから

$$0.5 \mu\text{g} / 70\text{mg} = 7.1 \times 10^{-6}$$

$$0.5\text{g} / 100\text{mg} = 5.0 \times 10^{-6}$$

ウエスタンブロット法で評価できる PrP^{Sc} 量は約 $1/10^6$ 以下に減少していると考えられた。

その他

濃縮・調整した試料の一部はリン酸緩衝液にて再浮遊し、その上清を tga20 マウス（マウスプリオン遺伝子過発現マウス：マウスプリオン高感受性マウス）に脳内接種し感染性の有無の確認を行っている。