

# 第3章 調査研究

# 平成 28 年度 調査研究

- 1 *Mycoplasma bovis* が関与した牛の心内膜炎調査  
阿久根食肉衛生検査所 神田 卓弥
- 2 鹿児島県内の大規模食鳥処理場で分離された *Salmonella Infantis*, *S.Schwarzengrund* 及び *S.Manhattan* の保有プラスミドと薬剤耐性  
大口食肉衛生検査所 肝付 智文
- 3 豚枝肉における微生物汚染調査（平成 27 年度微生物部会調査研究報告）  
志布志食肉衛生検査所 芝野 秀和
- 4 食鳥処理場で分離された大腸菌の薬剤感受性  
鹿屋食肉衛生検査所 柴沼 拓矢
- 5 BLV 陰性牛でみられた B 細胞性リンパ腫  
末吉食肉衛生検査所 岡 佐由利
- 6 牛にみられた腹腔内播種性腫瘍の 1 例  
志布志食肉衛生検査所 井上万悠子
- 7 と畜場における牛枝肉の衛生対策  
知覧食肉衛生検査所 寺崎 仁美
- 8 FSIS（米国食品安全検査局）指摘事項の変遷  
末吉食肉衛生検査所 林 義久
- 9 過去 10 年間のと畜検査データのまとめ及び検査所におけるフィードバック事業の取り組み  
串木野食肉衛生検査所 末吉 敏
- 10 と畜場における口蹄疫実務実践型防疫演習の概要と検証  
阿久根食肉衛生検査所 城間 健

# Mycoplasma bovis が関与した牛の心内膜炎

○神田 卓弥 濱田 忠子\* 外園 千代 吉満 文隆

阿久根食肉衛生検査所 \*北薩家畜保健衛生所

## はじめに

*Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) は牛において気管支肺炎, 乳房炎, 関節炎, 中耳炎等の様々な病態に関与しており, 世界中でそれがもたらす経済的損失が問題になっている[2]。また, *M. bovis* のサイズは 0.2  $\mu$  m 程度と真正細菌で最小であることから, 光学顕微鏡検査による菌体の確認は困難であるために, *M. bovis* 検出には, Polymerase Chain Reaction (PCR), Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)等の遺伝子検出が広く用いられている。このことから, 食肉衛生検査所における一般細菌検査により本菌を摘発することは困難である。

と畜検査において牛の心臓より直径 7 cmの疣贅物が確認された疣贅性心内膜炎に遭遇し, 心臓病変のスタンプ培養より,  $\beta$  溶血を呈した微小コロニーの発育を認めた。ところが, 光学顕微鏡検査による菌体の確認は不可能であったため, *Mycoplasma* を疑い PCRにより *M. bovis* と同定された。そこで, 巨大な疣贅物(5 cm以上)を伴った疣贅性心内膜炎に *M. bovis* が関与していると推測し, 症例の収集を行い詳細な検査を実施した。

## 材料と方法

### 1. 材料

2015年11月より2016年7月の期間において, 鹿児島県が管轄すると畜場に搬入された牛 63,856 頭を対象にと畜検査を行い, 40 頭の疣贅性心内膜炎の牛のうち直径 5 cm以上の疣贅物が心内膜に確認された牛 5 頭を供試した(表 1)。

細菌学的検査材料として, 心臓(心内膜疣贅物を含む), 肺, 肝臓, 腎臓および脾臓を用いた。と畜検査直後に検査を実施できない場合は, -80 °Cで保存後, 検査を実施した。

病理学的検査材料として, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓および脾臓を採材し, 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

### 2. 培養方法

*M. bovis* 分離として, 心臓および肺をそれぞれ 1cm<sup>3</sup>

表1 牛データ

症例No	1	2	3	4	5
月齢	26	24	27	29	29
品種	JB	JB	JB	JB	JB

\*JB=黒毛和種

角で採材し, PPLO 液体培地(Mycoplasma Base medium (BD), 15% 馬血清(日本シーラム社), 25g/L 酵母エキス(OXOID), 0.1g/L D-グルコース(関東化学), 1MU/L ペニシリン G (MP biochemical))に接種, 37 °C, 24 時間培養した。その後, 上清を新たな PPLO 液体培地にて上記の温度条件で 1 週間培養後, PPLO 寒天培地(12g/L Bact Agar (BD)添加 PPLO 液体培地)に画線塗抹し, 微好気条件, 37 °Cで 1 週間程度培養した。分離したコロニーは PPLO 液体培地に接種し, 増

表2 プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5' -3')	増幅サイズ	参照
16s rDNA	MboF	CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG	360bp	[3]
	MboR	CCGTC AAGGTAGCATCATTTCCTAT		
uvr C	MbuvrF	TTACGCAAGAGAATGCTTCA	1562bp	[7]
	MbuvrR	TAGGAAAGCACCTATTGAT		

菌培養を上記条件で行った後、-80℃で保存した。

*M. bovis* 以外の細菌分離として、鹿児島県の実定める敗血症の検査手順に基づき、心臓、腎臓、肝臓および脾臓を 5%羊血液寒天培地にスタンプ、37℃で微好気ならびに嫌気条件で、1週間程度培養を行った。

### 3. 同定方法

増菌した PPLO 液体培地 100 μL を 15000xg で遠心し、菌体の回収を実施後、InstaGene (BIO-RAD) を用い菌体の DNA 抽出を実施した。16S rDNA, *uvrC* 領域を標的にしたプライマー(表 2)を用い *M. bovis* 特異的 PCR を実施し、双方で陽性となったものについて *M. bovis* と同定した。なお、反応条件、プライマー濃度はプライマーの参考文献[3,7]に準拠し、DNA ポリメラーゼには KOD FX neo (TOYOBO) を用いた。

### 4. 病理学的検査法

ホルマリン固定材料は、定法に基づき、厚さ 3μm のパラフィン切片を作製した。パラフィン切片は、ヘマトキシリンエオンジン(HE)染色、グラム染色、抗酸菌染色、マッソントリクローム(MT)染色を行った。

パラフィン切片からの *M. bovis* 抗原検出として、免疫組織化学染色(IHC)を動物衛生研究所に依頼した。

## 結 果

### 1. 症例

全 5 症例は生体検査において、著変を認めず、と畜までの 3 か月以内の加療履歴もなかった。また、5 頭それぞれは肥育牛として、すべて異なる農場で飼養されていた。

すべての症例で直径 7 ~ 12cm の黄白色の乾酪性の

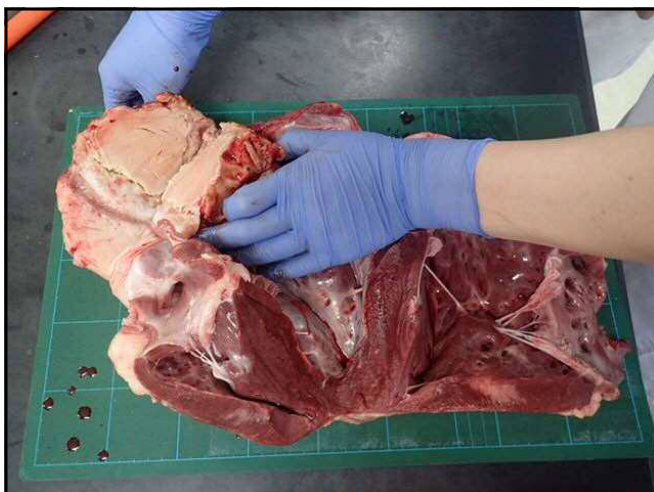


図 1 疣贅物および心臓肉眼所見

左心房に 10cm 程度の乾酪性疣贅物付着(症例 5)。

疣贅物がそれぞれ 5 症例で左心房壁に形成されていた(図 1)。縦隔リンパ節、気管支リンパ節は腫大していた。腎臓、肝臓および脾臓には斑状出血および壊死斑が観察された。肺において斑状出血あるいは肺水腫が確認された症例もあった。それ以外の著変は認められなかった。

### 2. 細菌分離

全 5 症例の心内膜疣贅物より *M. bovis* が分離され、その他の細菌は分離されなかった(表 3)。肺、腎臓、肝臓および脾臓から、*M. bovis* ならびにその他の細菌は分離されなかった(表 3)。

表3 細菌分離結果

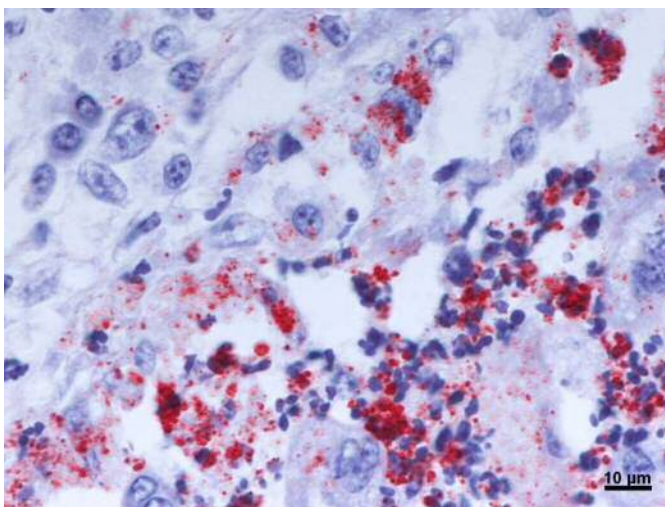
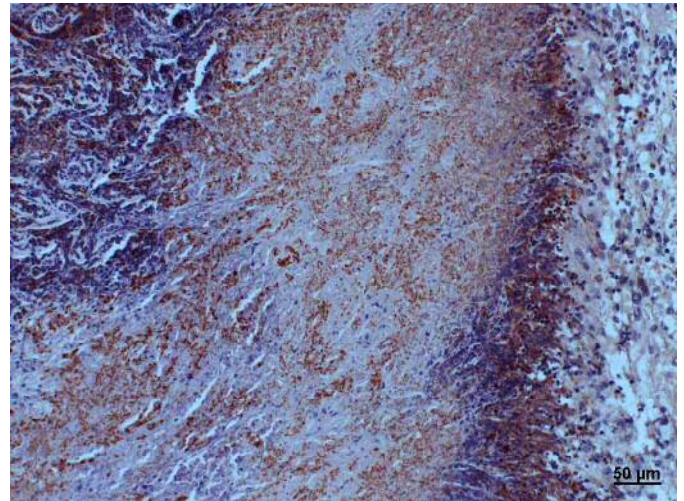
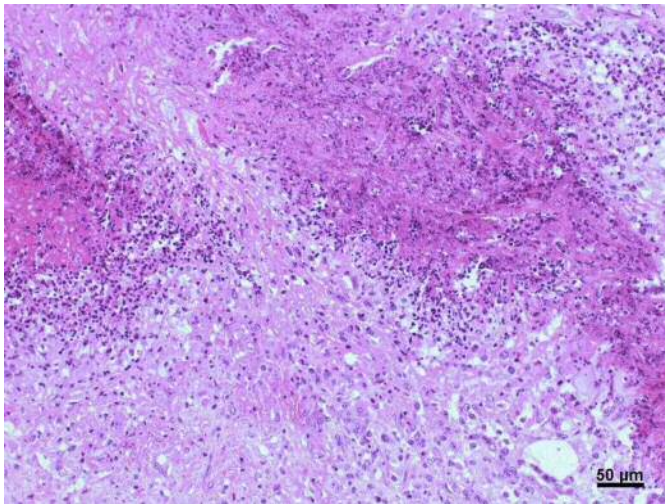
症例No	菌種	臓器別菌分離				
		心臓	肺	肝臓	腎臓	脾臓
1	<i>M. bovis</i>	+	ND	ND	ND	ND
	他菌	neg	ND	neg	neg	neg
2	<i>M. bovis</i>	+	neg	ND	ND	ND
	他菌	neg	neg	neg	neg	neg
3	<i>M. bovis</i>	+	ND	ND	ND	ND
	他菌	neg	ND	neg	neg	neg
4	<i>M. bovis</i>	+	neg	ND	ND	ND
	他菌	neg	neg	neg	neg	neg
5	<i>M. bovis</i>	+	neg	ND	ND	ND
	他菌	neg	neg	neg	neg	neg

+: 陽性, neg: 陰性, ND: 未実施

### 3. 病理所見

心内膜の疣贅物は石灰化を伴う壊死巣を被覆する肉芽腫であった。病変部は結合組織の著しい増生が確認され、MT 染色においても膠原線維が確認された。また、結合組織内には壊死巣、石灰化も散見された。壊死巣周囲にはマクロファージ、好中球、リンパ球といった炎症細胞の浸潤が認められ、IHC において、炎症細胞、壊死巣に *M. bovis* 抗原陽性が認められた(図 2)(表 4)。マクロファージ泡沫内、多核巨細胞内においても *M. bovis* 抗原が顆粒状に認められた(図 2)。なお、グラム染色ならびに抗酸菌染色による他の菌体は確認されなかった。肺、腎臓、肝臓および脾臓において *M. bovis* 抗原および他の菌体は検出されなかった(表 4)。

図 2 心臓病変組織所見



左上:エオジン好性を呈する壊死巣の周囲にマクロファージ, 好中球, リンパ球などの炎症細胞が浸潤

(症例 5, HE, Bar=50µm)

右上:壊死巣および周囲の炎症細胞に *M. bovis* 抗原陽性

(症例 3, IHC, Bar=50µm)

左下:マクロファージ泡沫内, 多核巨細胞内に *M. bovis* 抗原陽性

(症例 5, IHC, Bar=10µm)

肺において, 肺胞腔内に線維素の析出が確認されたが, *M. bovis* による気管支肺炎の組織所見は認められなかった。腎臓, 肝臓および脾臓において, 著変は認められなかった。

かつ他の細菌の関与が認められなかったことから, 全 5 症例で *M. bovis* の単独関与が示唆された。

一般的に *M. bovis* は特殊な培地が必要とされているが, 当検査所の使用した羊血液寒天培地(日水)に発育が認められた。日水の羊血液寒天培地には全血, 酵母抽出物が含まれるために PPLO 培地に組成が近く, *M. bovis* が発育したと推察された。

一般的に牛の疣贅性心内膜炎において, 疣贅物は右心系の弁に形成されることが多い[1]が, 本調査の全症例で弁に著変は認められず, 左心房壁に巨大な乾酪性の疣贅物が付着していた。また, 心内膜に認められた肉芽腫の病理組織学的所見は *M. bovis* による子牛の気管支肺炎, 関節炎の病理学的組織所見に類似しており[5,9], このことから, *M. bovis* が関与していると思われた。

肺の微生物学的検査を実施した 3 症例において肺から *M. bovis* は分離されず, IHC を実施した 1 症例か

表4 IHC実施結果

症例No	心臓	肺	肝臓	腎臓	脾臓
1	ND	ND	ND	ND	ND
2	+	ND	ND	ND	ND
3	+	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	+	neg	neg	neg	neg

+:陽性, neg:陰性, ND:未実施

### 考 察

本研究において, 心内膜炎病変部より, *M. bovis* が分離され, IHC においても *M. bovis* 抗原が確認され,

らも *M. bovis* 抗原は検出されず、*M. bovis* が関与した気管支炎が認められなかったことから、呼吸器系と心内膜炎の関連は認められなかった。また、心臓病変部は厚い結合組織の増生、石灰化を認めたことから時間の経過した慢性病変であると推察され、関与した *M. bovis* の侵入経路、発生機序等の特定には至らなかった。

全 5 症例いずれも出荷前 3 か月間において農場での加療処置はなく、本疾病に罹患していても、不顕性であった。また、病理組織学的所見において、諸臓器に著しい機能障害は認められず、複数臓器より *M. bovis* が分離されなかったことから、本疾患により敗血症となる可能性は低いと考えられた。しかしながら、羊で *Mycoplasma agalactiae* における一過性の敗血症の報告[6]、*M. bovis* の赤血球感染能も確認されているため[4]、完全に敗血症を否定はできないと思われた。

本研究の実施期間において、疣贅性心内膜炎は 40 例あり、そのうちの 5 例が *M. bovis* が関与していたこと、*M. bovis* は鼻腔に健康畜でも 30%程度は保有しており[8]、それらが血行性に感染する可能性もあり、本症例を軽視することはできず、疣贅物の破砕物による塞栓症のリスクもあると考えられ、今後もさらなる調査が必要であると思われた。

## 謝 辞

本調査における免疫組織化学染色実施ならびに診断いただいた動物衛生研究所九州拠点 田中省吾 先生、本調査に関するご助言、ご高閲を賜りました宮崎大学農学部獣医学科 末吉益雄 教授、同 上村涼子 助教に厚く感謝申し上げます。

本調査を実施するにあたり、鹿児島県下のサンプル提供にご尽力いただいた鹿児島県各食肉衛生検査所ならびに各と畜場関係各位、最後に、当検査所にご協力、ご高閲の労を賜りましたこと深く感謝申し上げます。

す。

## 参 考 文 献

- [1]Bradford P. smith(2015). Large animal internal medicine. 5th edition. 439-440
- [2]Burki S et al (2015). Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. Vet Microb. 179. 15-22.
- [3] Chavez Gonzalez YR et al (1995). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. Vet Microbiol, 47, 183-190.
- [4] Jacques van der Merwe et al (2010). Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. American society of Microb. 78. 4570-4578.
- [5]Kathrin Hermeyer et al (2012). Chronic pneumonia in calves after experimental infection with *Mycoplasma bovis* strain 1067: Characterization of lung pathology, persistence of variable surface protein antigens and local immune response. Acta Vet Scand. 54. 9
- [6]Mariasoria marinaro et al (2015). Changes in peripheral blood leucocytes of sheep experimentally infected with *Mycoplasma agalactiae*. Vet Microb. 175. 257-264.
- [7] Subramaniam S et al (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC genes by PCR. Mol Cell Probes, 12, 161-169.
- [8]上村涼子ら(2012). 日本国内における牛の呼吸器感染性 *Mycoplasma* の浸潤状況調査. 日獣会誌. 65. 871-875
- [9]Vemuri Rama Devi et al (2014).Histopathological findings, phenotyping of inflammatory cells, and expression of markers of nitritative injury in joint tissue samples from calves after vaccination and intraarticular challenge with *Mycoplasma bovis* strain 1067.Acta Vet Scand.56:45.

# 鹿児島県内の大規模食鳥処理場で分離された *Salmonella* *Infantis*, *S. Schwarzengrund* 及び *S. Manhattan* の保有プラスミドと薬剤耐性

○肝付智文 赤坂敬史郎 城間健<sup>1)</sup> 新原政一

大肉食肉衛生検査所 1) 阿久根食肉衛生検査所

## はじめに

平成 26 年度鹿児島県食肉衛生検査所協議会微生物部会の調査では、県内の食鳥処理場において 8 系列 55 農場から 114 株のサルモネラが分離され、*Salmonella* *Infantis* (以下 *S.I*)、*S. Schwarzengrund* (以下 *S.S*) 及び *S. Manhattan* (以下 *S.M*) の 3 血清型が 9 割を占めていた。薬剤感受性試験を実施したところ、血清型で異なる薬剤耐性が認められた。薬剤耐性にはプラスミドの関与が知られていることから、今回、分離された主要な 3 血清型における保有プラスミドと薬剤耐性の関連について調べた。また、パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学解析も実施したのでこれらについて報告する。

## 材料および方法

8 系列 55 農場から分離されたサルモネラ 114 株のうち、農場、由来鶏群、血清型、耐性パターンが異なる 3 血清型の 52 株を用いた (表 1)。

表 1 52 株の内訳

血清型	系列農場								計
	A	B	C	D	E	F	G	H	
<i>S. Infantis</i>	3	2	7	0	3	0	3	1*	19
<i>S. Schwarzengrund</i>	11	1	4	0	2	1	1	0	20
<i>S. Manhattan</i>	0	0	1	1	11	0	0	0	13
計	14	3	12	1	16	1	4	1	52

1株(\*)はレイヤーから分離  
51株はブロイラーから分離

## 結果および考察

得られた PFGE 像 (図 2) をもとに、3 血清型の dendrogram を作成した (図 3)。

その結果、菌株間で多少の差異は認められるものの、それぞれ 80% 以上の高い近縁性を示した。

- ・遺伝子型別  
パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)  
制限酵素 Xba I: *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund* 及び *S. Manhattan*  
Bln I: *S. Schwarzengrund* 及び *S. Manhattan*
- ・プラスミド抽出、解析  
関崎の変法、プラスミドパターン
- ・レプリコンタイピング  
PCR (IncP, IncX1)
- ・薬剤耐性  
拡散法  
- ディスク法: アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフトキシチン (CFX), オキシテトラサイクリン (OTC), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), オフロキサシン (OFLX), クロラムフェニコール (CP)  
- 薬剤感受性キット (Etest): スルファメキサゾール (SUL)

図 1 方法

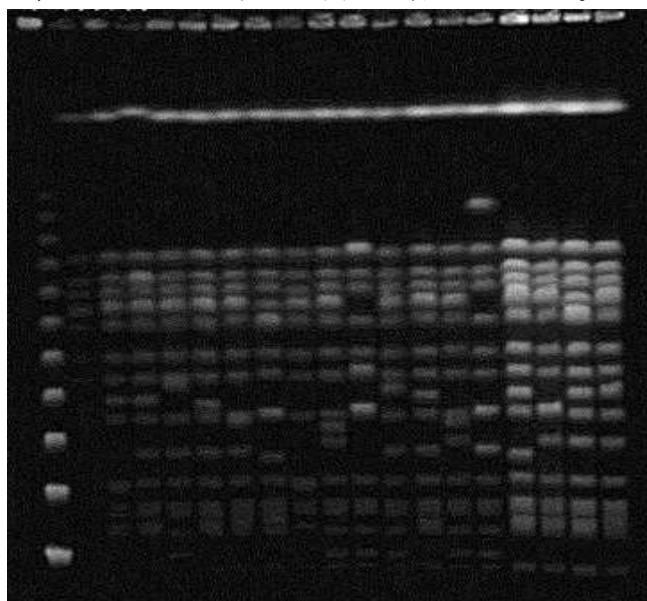


図 2 *S. Infantis* 17 菌株の PFGE 像

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行い、

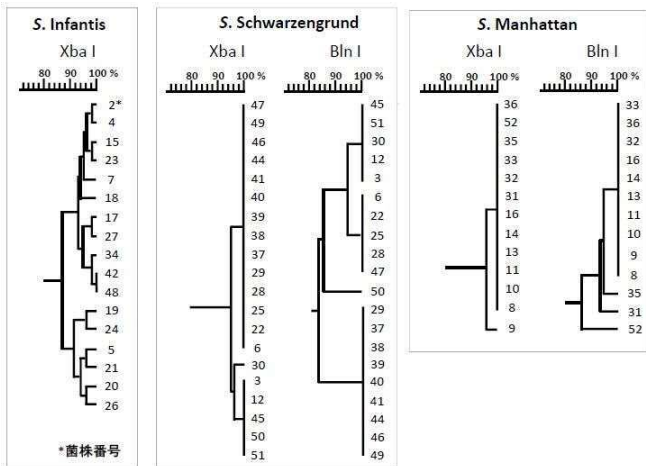
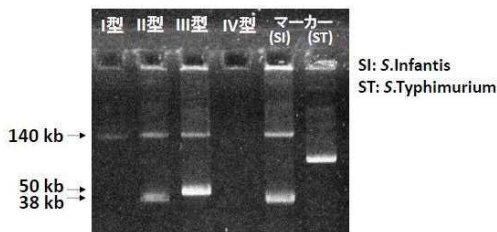


図3 PFGEに基づくデンドログラム

プラスミドパターンは 140kb プラスミドを有する I 型, 140kb, 38kb プラスミドを有する II 型, 140kb, 50kb プラスミドを有する III 型, プラスミドを有しない IV 型に分けられた (図 4)。I 型が最も多く 40 株, 次いで II 型 10 株, III 型, IV 型は各 1 株で, I ~ III 型はすべて 140kb プラスミドを有し, ブロイラーから分離されたものであった。一方, プラスミドが検出されなかった IV 型 1 株は, レイヤーから分離されたものであった。



	140kb (I型)	140kb, 38kb (II型)	140kb, 50kb (III型)	ND (IV型)
S.I (n=19)	16	2	0	1*
S.S (n=20)	20	0	0	0
S.M (n=13)	4	8	1	0
計	40	10	1	1

ND: Not detected

図4 プラスミドパターン

レプリコンタイピングでは, 140kb プラスミドでレプリコンタイプが IncP を示したものは約 9 割であった。一方, 38kb プラスミドのレプリコンタイプはすべて IncX1 であった (図 5)。

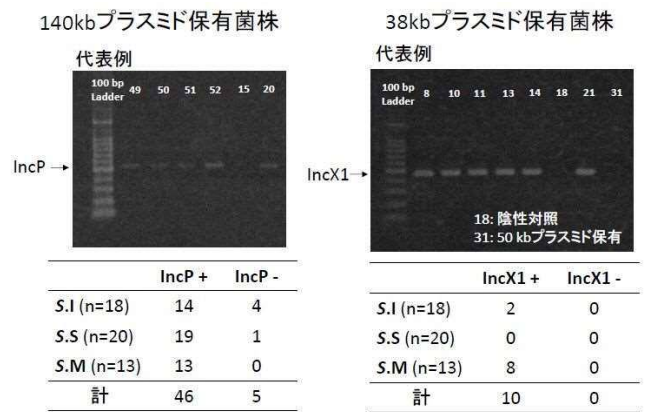


図5 プラスミドのレプリコンタイピング

140kb プラスミドを有する菌株で IncP を示したものでは大部分が SUL, OTC, SM に耐性であったが, IncP 示さなかったものではほとんどが感性または中間を示した (図 6)。

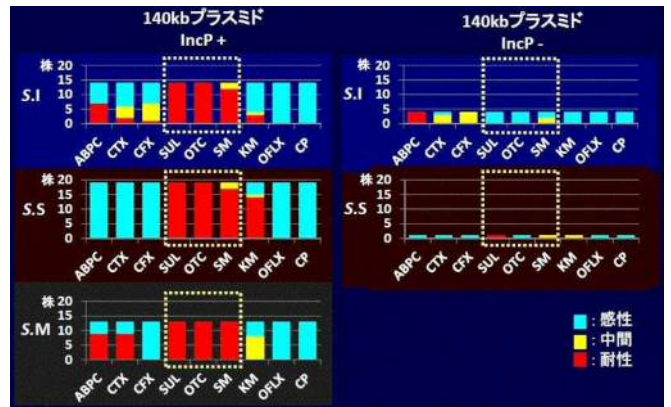


図6 プラスミドと薬剤耐性 (1)

II 型では, 大部分が ABPC, CTX に耐性を示した。一方, 38kb プラスミドを有しない I 型ではそれらに感性を持つものが多く認められた (図 7)。

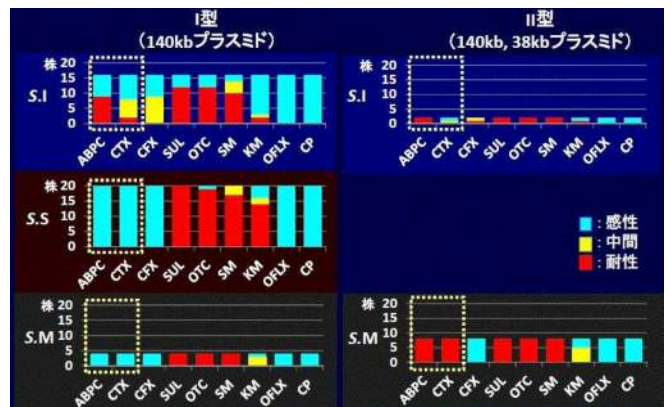


図7 プラスミドと薬剤耐性 (2)



50kb プラスミドを有する III 型の 1 株では、II 型と同様、ABPC、CTX に耐性を示した。プラスミドを有しない IV 型の 1 株では、すべての薬剤に感性を示した (図 8)。

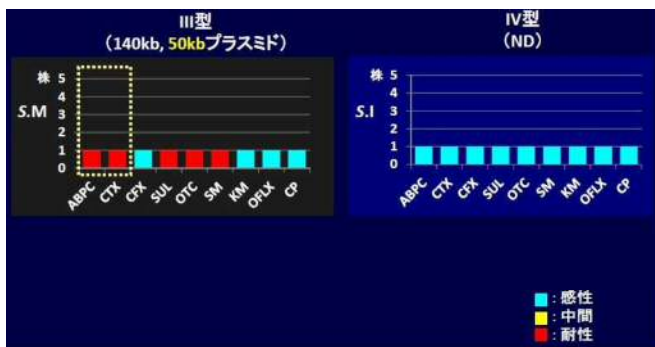


図 8 プラスミドと薬剤耐性 (3)

これらの結果から、①レプリコンタイプが IncP を示す 140kb のプラスミドは 3 血清型のいずれにおいても SUL、OTC、SM の耐性に関与している、②レプリコンタイプが IncP を示さない 140kb のプラスミドは 3 剤に感性の菌株が多く認められ、耐性遺伝子の変異・脱落している可能性がある、③レプリコンタイプが IncX1 の 38kb のプラスミドは S.M で多く認められ、ABPC、CTX の耐性に関与している、ことが考えられた。

140kb プラスミド、38kb プラスミドについて系列農場による比較を行ったところ、レプリコンタイプ IncP を示す 140kb のプラスミドは 7 系列農場で検出され、IncP を示さない 140kb のプラスミドは 2 系列農場で検出された (図 9)。



図 9 系列農場による比較

一方、38kb プラスミドは 3 系列農場で認められ、特に 1 系列農場の S.M で多かった。

これらの結果から、①レプリコンタイプが IncP を示す 140kb のプラスミドは SUL、OTC、SM 耐性の菌株が県内の農場に広く分布していることに関与している、② 38kb プラスミドは ABPC、CTX の耐性の菌株が特定の系列農場、血清型に限定的に存在していることに関与している、と考えられた。

鹿児島県内における S.I、S.S 及び S.M の菌株は、それぞれの血清型で高い近縁性を示す株が分離され、同一菌株に由来すると考えられたが、同じ血清型でも薬剤耐性に違いが認められた。これには 140kb プラスミドおよび 38kb プラスミドが大きく関与し、系列農場間での薬剤耐性の違いにも影響していることが推察された。

## 謝 辞

本調査研究の実施においてご指導いただきました鹿児島大学獣医公衆衛生学教室の中馬教授に感謝致します。

# 豚枝肉における微生物汚染調査 (平成27年度微生物部会調査研究報告)

○芝野秀和 窪田かをり 岩元美鈴 濱田忠子 有富正文 山下章吾 有馬智子  
笑喜東洋一 藤元英樹 (平成27年度微生物部会)  
志布志食肉衛生検査所

## はじめに

鹿児島県内の食肉衛生検査所では、厚生労働省通知による「と畜場における枝肉の微生物汚染実態調査等について」に基づく最終洗浄後の枝肉の拭き取り調査成績を、所管すると畜場への衛生監視指導の一助として活用している。

しかし、これまで最終洗浄以降の枝肉保管工程からカット処理前までにおける細菌汚染及び増殖に関するデータはほとんどなかったため、枝肉保管庫内での細菌汚染調査を実施することとした。併せて、今回の調査成績(以後、「保管庫枝肉」)、厚生労働省通知に基づく平成27年度拭き取り調査成績(以後、「洗浄後枝肉」)及び各処理場における処理工程の比較により、枝肉保管工程での一般生菌数の動向及び各施設の解体処理工程における汚染の拡大または制御に関与する工程について検討したので、概要を報告する。

## 材料及び方法

保管庫内枝肉の調査については、県内の処理場8施設(湯剥ぎ式(A~D)、皮剥ぎ式(E~H)各4施設)において、枝肉保管庫内でカット処理前の豚枝肉の胸部及び肛門周囲部各100cm<sup>2</sup>を、各施設20頭分40検体拭き取り材料とした。調査は一般生菌数、大腸菌群数及びその他細菌検査(サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌、シュードモナス属菌、エルシニア・エンテロコリチカ)について実施した。一般生菌数及び大腸菌群数については、部位毎(胸部、肛門周囲部各160検体)にペトリフィルム法を用いて1cm<sup>2</sup>あたりの菌数を算出し、その他細菌検査については各部位の検体を等量混合したもの(計160検体)を試料として、「食品衛生検査指針 微生物編」(日本食品衛生協会)に準拠して行った。

処理工程の比較については、各処理場の工程フロー図を参考に細菌数に関与すると考えられる工程を抽出し、処理場毎の一般生菌数を用いて幾何平均で比較した。また、一般

生菌数の動向及び処理工程の比較については、t検定を用いて統計処理を行った。

## 成績

保管庫枝肉の一般生菌数は、7施設で肛門周囲部より胸部の菌数が多く、湯剥ぎ式の3施設(施設A、B及びC)では胸部及び肛門周囲部ともに8施設の平均を大きく上回る菌数であった(図1)。大腸菌群数は、3検体(胸部1検体、肛門周囲部2検体)を除き有効コロニー数(3cfu/cm<sup>2</sup>)以上の検出はなかった。その他細菌検査では、シュードモナス属菌が7施設で27検体検出されたが、1施設を除いて散発的な検出に留まっており、また、感染症関連菌である緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は認められなかった。

洗浄後枝肉の一般生菌数は、保管庫枝肉と同様、肛門周囲部より胸部の菌数が多い傾向を示した(図2)。一般生菌数の動向については、洗浄後枝肉(胸部 $6.2 \times 10 \text{cfu/cm}^2 \pm 9.2$ 、肛門周囲部 $2.2 \times 10 \text{cfu/cm}^2 \pm 5.8$ )より保管

庫枝肉(胸部 $3.6 \times 10 \text{cfu/cm}^2 \pm 20.7$ , 肛門周囲部 $7.7 \text{cfu/cm}^2 \pm 11.6$ )で菌数が少ない傾向にあった。

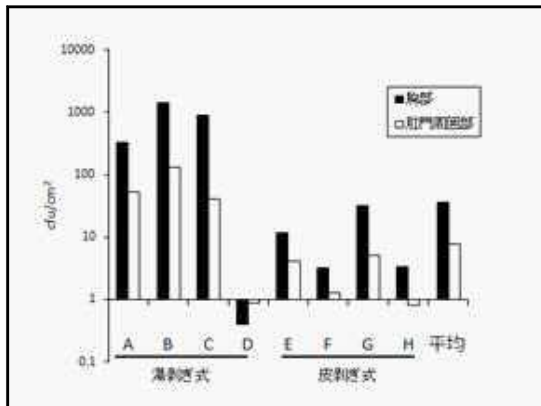


図1 保管庫枝肉の一般生菌数

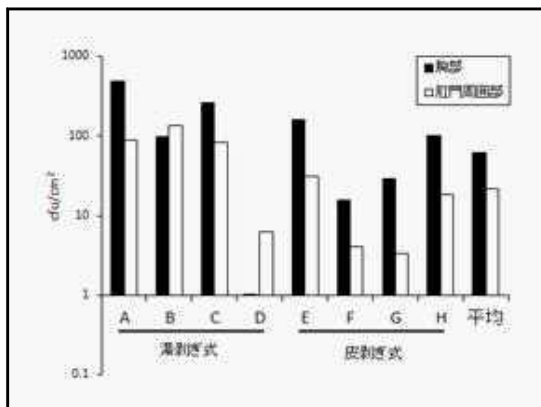


図2 洗浄後枝肉の一般生菌数

処理工程の比較(図3)については、剥皮方式で比較した場合、湯剥ぎ式施設で菌数が多い傾向にあった(表1)。また、剥皮方式毎に比較した場合、湯剥ぎ式施設では(ア)最終洗浄水への消毒薬添加なし、または(イ)棘突起分離機や足切りなど最終洗浄後に作業工程がある施設で菌数が多い傾向にあった(表2)。一方で、皮剥ぎ式施設では(ウ)剥皮後内臓摘出を行う、または(エ)最終洗浄水に消毒薬添加なしの施設で菌数が多い傾向にあった(表3)。

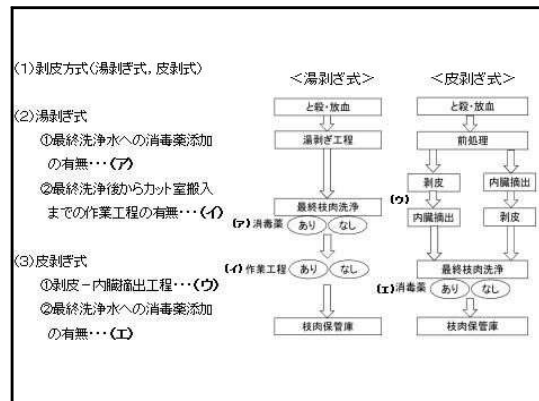


図3 処理工程の比較

表1 剥皮方式における一般生菌数の比較

		湯剥ぎ式	皮剥ぎ式
胸部	洗浄後枝肉	$7.3 \times 10 \pm 15.1$	$5.2 \times 10 \pm 5.0$
	保管庫枝肉	$1.6 \times 10^2 \pm 14.4$	$8.2 \pm 5.1$
肛門周囲部	洗浄後枝肉	$5.0 \times 10 \pm 4.9$	$9.6 \pm 4.6$
	保管庫枝肉	$2.3 \times 10 \pm 12.4$	$2.3 \pm 5.4$

(cfu/cm<sup>2</sup>±幾何標準偏差)  
 : 菌数が多い(有意差あり)

表2 湯剥ぎ式における一般生菌数の比較

(ア)最終洗浄水への消毒薬の添加			
		あり	なし
胸部	洗浄後枝肉	$1.3 \times 10 \pm 16.0$	$3.5 \times 10^2 \pm 5.9$
	保管庫枝肉	$4.2 \times 10 \pm 83.6$	$5.4 \times 10^2 \pm 5.2$
肛門周囲部	洗浄後枝肉	$2.9 \times 10 \pm 6.5$	$8.6 \times 10 \pm 2.7$
	保管庫枝肉	$1.2 \times 10 \pm 23.2$	$4.6 \times 10 \pm 4.2$

(イ)最終洗浄後の作業工程			
		あり	なし
胸部	洗浄後枝肉	$2.2 \times 10^2 \pm 3.5$	$2.2 \times 10 \pm 28.2$
	保管庫枝肉	$6.9 \times 10^2 \pm 4.6$	$3.2 \times 10 \pm 62.0$
肛門周囲部	洗浄後枝肉	$1.1 \times 10^2 \pm 2.6$	$2.3 \times 10 \pm 5.4$
	保管庫枝肉	$8.3 \times 10 \pm 5.9$	$6.4 \pm 12.4$

(cfu/cm<sup>2</sup>±幾何標準偏差)  
 : 菌数が多い(有意差あり)

表3 皮剥ぎ式における一般生菌数の比較

(ウ)剥皮-内臓抽出工程			
		剥皮-内臓抽出	内臓抽出-剥皮
胸部	洗浄後枝肉	1.3×10 <sup>2</sup> ±3.4	6.5±3.9
	保管庫枝肉	2.1×10±4.3	1.0×10±5.6
肛門周囲部	洗浄後枝肉	2.4×10±2.9	3.7±3.9
	保管庫枝肉	2.0±4.0	2.8±6.3

(エ)最終洗浄水への消毒薬の添加			
		あり	なし
胸部	洗浄後枝肉	3.6×10±5.1	1.6×10 <sup>2</sup> ±2.4
	保管庫枝肉	7.3±5.0	1.2×10±4.2
肛門周囲部	洗浄後枝肉	6.4±4.4	3.2×10±2.5
	保管庫枝肉	1.9±6.0	4.1±4.3

(cfu/cm<sup>2</sup>±幾何標準偏差)  
 : 菌数が多し(有意差あり)

### 考察

保管庫枝肉の成績は、全体に洗浄後枝肉に比べ低い傾向にあり、保管庫内における細菌の増殖や汚染の拡大はないものと考えられた。

洗浄後枝肉及び保管庫枝肉共に、一般生菌数が胸部で多かったことは、枝肉洗浄水が枝肉上部から胸部に流れることや処理工程上、肛門周囲部に比べ作業等との接触する頻度が高いことによるものと考えられた。また、湯剥ぎ式の1施設(施設D)で菌数が少なかったことは、湯剥ぎ処理後の殺菌焼き、トリミングの徹底及び枝肉洗浄後の急速冷却などの菌数を低減させる工程があったためだと考えられる。また、大腸菌群数及びその他細菌検査成績から、腸管系由来細菌は全施設で概ね制御されていると考えられた。

一般生菌数の動向については、上記のように枝肉保管工程では菌数が制御されており、解体処理工程での取り扱いが菌数に影響を及ぼすと考えられた。

処理工程の比較検討については、各施設で工程数及び作業内容が異なるため、施設全体における単純比較は困難であった。しかし、個々の工程毎に比較した場合、消毒薬の添加など特定の工程において菌数への関与が示唆された。これらのことより、菌数に影響を及ぼす要因は施設毎で様々であり、更なる

検討が必要であると考えられた。

### まとめ

平成26年度のと畜場法施行規則の一部改正で、と畜場における衛生管理については「HACCP導入型」と「従来基準型」の選択制となった。今回の調査から処理工程の比較検討、工程評価を行うことは、HACCPを用いた衛生管理を目指す施設に対し、助言・指導を行う上で有用だと考えられる。

# 食鳥処理場で分離された大腸菌の薬剤感受性

○柴沼拓矢 吉屋幸久 矢野貴久 東山崎達生 田中嘉文 郷原郁美  
鹿屋食肉衛生検査所

## はじめに

当所管内 A 工場は、年間約 2000 万羽を処理する大規模処理場であるが、近年大腸菌症による全部廃棄羽数の増加がみられ、平成 24 年度に 8 万羽であった大腸菌症による廃棄羽数が平成 27 年度には 19 万羽に及んでいる。そこで、工場直営農場における大腸菌症対策に寄与する試みとして、直営農場エリア①・②より出荷された鶏を対象に、と体から大腸菌を分離し各種薬剤に対する感受性を調べ、飼養管理状況の聞き取り調査を行った。

TC(4/15), OFLX(1/15), EFLX(2/15), ST(4/15)

## 材料と方法

平成 28 年 4～7 月に処理された鶏のうち腹部膨満や発育不良などを示す食鳥と体を脱羽後に 43 羽(エリア①: 19 羽, エリア②: 24 羽)採材した。検体は無菌操作により開腹、主要臓器(心, 肝, 腎, 脾)を DHL 寒天培地にスタンプし培養後、赤色コロニーについて簡易同定キット (Api rapid ID 32) を用い、大腸菌と判定されたものについて薬剤感受性試験に供した。分離した大腸菌については O 血清型の判定を行った。

薬剤感受性試験は、ミューラーヒントン寒天培地を用いアンピシリン(ABPC), カナマイシン(KM), ストレプトマイシン(SM), クロラムフェニコール(CP), テトラサイクリン(TC), ノルフロキサシン(NFLX), オフロキサシン(OFLX), エンロフロキサシン(EFLX), ST 合剤(ST), コリスチン(CL)の 10 種薬剤に対して、ディスク法にて行った。

## 結果

(1) 培養の結果エリア①(15/19)羽, エリア②(13/24)羽から大腸菌が分離され、O 血清型は O78 が最も多かった(表 1・2)。薬剤感受性試験の結果、エリア①では ABPC(13/15), KM(13/15), SM(10/15),

に耐性菌が見られ CP, NFLX, CL では見られなかった(表 3)。エリア②では ABPC(7/13), KM(13/13), SM(6/13), TC(8/13), EFLX(2/13), ST(3/13), CL(1/13)に耐性菌が見られ CP, NFLX, OFLX では見られなかった(表 4)。



図 1 採材検体の解体所見

エリア①						エリア②					
検体 No. 菌株 No.	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	O血清	検体 No. 菌株 No.	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	O血清
1(1-1)	+	+	+	+	078	15(1-13)	+	-	+	-	分類不能
2(1-2)	+	+	+	+	078	16(-)	-	-	-	-	-
3(1-3)	+	+	+	+	078	17(-)	-	-	-	-	-
4(1-4)	+	-	-	+	06	18(1-14)	-	+	+	+	分類不能
5(1-5)	-	-	+	+	分類不能	19(1-15)	+	+	-	+	06
6(1-6)	+	-	+	-	01						
7(-)	-	-	-	-	-						
8(1-7)	+	+	+	+	02						
9(1-8)	+	+	+	+	分類不能						
10(1-9)	+	-	+	-	分類不能						
11(1-10)	-	-	+	-	分類不能						
12(1-11)	+	+	+	+	06						
13(1-12)	-	-	+	-	分類不能						
14(-)	-	-	-	-	-						

+: 大腸菌分離  
-: 大腸菌非分離

表 1 エリア①大腸菌分離状況

### 臓器別大腸菌分離状況

エリア②

検体No. 菌株No.	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	〇血清	検体No. 菌株No.	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	〇血清
1(-)	-	-	-	-	-	15(2-9)	-	+	-	-	分類不能
2(-)	-	-	-	-	-	16(2-10)	-	-	+	-	分類不能
3(2-1)	+	+	-	+	分類不能	17(-)	-	-	-	-	-
4(2-2)	+	+	+	-	073	18(2-11)	-	-	+	-	分類不能
5(-)	-	-	-	-	-	19(-)	-	-	-	-	-
6(-)	-	-	-	-	-	20(-)	-	-	-	-	-
7(-)	-	-	-	-	-	21(-)	-	-	-	-	-
8(2-3)	-	-	+	-	分類不能	22(2-12)	-	-	+	-	分類不能
9(2-4)	+	+	+	-	分類不能	23(2-13)	-	+	+	-	分類不能
10(2-5)	+	+	+	-	分類不能						
11(2-6)	-	+	+	+	01						
12(2-7)	-	-	+	-	分類不能						
13(-)	-	-	-	-	-						
14(2-8)	-	+	-	-	分類不能						

表2 エリア②大腸菌分離状況

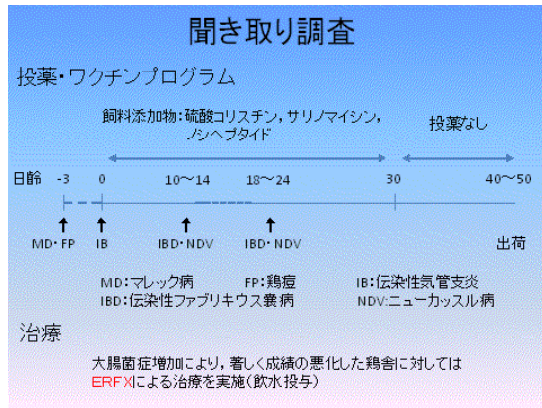


図2 投薬・ワクチンプログラム

### 薬剤感受性試験結果

エリア①

菌株No.	ABPC	KM	SM	CP	TC	NFLX	OFLX	EFLX	CL	ST
1-1	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S
1-2	R	R	R	S	R	S	S	I	S	R
1-3	R	I	R	S	S	S	S	I	S	R
1-4	R	I	R	S	S	S	R	R	S	R
1-5	R	R	R	S	R	S	S	I	S	R
1-6	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1-7	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S
1-8	I	R	R	S	R	S	S	R	S	S
1-9	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
1-10	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1-11	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
1-12	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S
1-13	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
1-14	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S
1-15	R	R	S	S	S	-	S	S	S	S

\* R(耐性), S(感受性), I(中間), - (阻止円の大きさが限界値を超えたため除外)

表3 エリア①薬剤感受性試験結果

### 薬剤感受性試験結果

エリア②

菌株No.	ABPC	KM	SM	CP	TC	NFLX	OFLX	EFLX	CL	ST
2-1	S	R	I	S	R	S	S	S	S	S
2-2	R	R	R	S	R	S	S	I	S	R
2-3	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S
2-4	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S
2-5	S	R	I	S	I	S	S	S	S	S
2-6	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
2-7	R	R	I	S	R	S	S	I	R	R
2-8	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
2-9	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
2-10	S	R	I	S	R	S	S	R	S	S
2-11	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
2-12	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2-13	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S

\* R(耐性), S(感受性), I(中間)

表4 エリア②薬剤感受性試験結果

### 考察

薬剤感受性試験の結果、分離菌株の大部分が複数の薬剤に対し耐性を示し、さらに治療薬である EFLX に対して4株が耐性を示したことから、今後耐性菌の発生状況について経過を観察する必要があると考えた。

農場では、今回提供したデータを今後の薬剤選択等に活用したいとのことであり、通常検査結果データに加え、今回の試みのようなデータを農場へフィードバックすることは、農場の状況把握や生産性向上に寄与すると考えた。

(2)農場管理者に試験データを提供し、聞き取り調査を実施した結果、農場では鶏舎内の換気調整の難しさから鶏の状態悪化を招き、大腸菌症の発生により発育成績が著しく低下した際には、ニューキノロン系薬剤を用いた治療を実施していた(図2)。

# BLV陰性牛でみられたB細胞性リンパ腫

○岡佐由利 中島靖剛<sup>1)</sup> 栗脇耕二 春口真一  
末吉食肉衛生検査所 1) 大口食肉衛生検査所

## はじめに

鹿児島県での成牛型牛白血病の判定にPCR検査または抗体価検査を用いるようになった2011年度以降、その発生頭数は漸次増加傾向にある。牛のリンパ腫は原因、年齢や病変分布などにに基づき、成牛型、子牛型、胸腺型、皮膚型に分類される。腫瘍細胞の由来は、一般的に、成牛型がB細胞、子牛型がB2もしくはT細胞の芽球系細胞、胸腺型と皮膚型はT細胞とされている。

しかし、いずれの病型にも該当しない非定型牛白血病の報告も見られ、その多くがT細胞性のものである。昨年度、管内と畜場においてBLVが関与しないB細胞性リンパ腫と考えられる症例に遭遇したので、その概要を報告する。

## 1 材料と方法

症例は、通常牛として搬入された黒毛和種、27ヶ月齢の去勢牛で、体格がやや小さいほか、生体検査で特に異常は認められなかった。(図1)

材料として血液、主要臓器(心臓・肝臓・腎臓・脾臓)、病変部、胸骨骨髓を採材し、塗抹標本を製作して細胞診を実施した。病理組織学的検査として、HE染色、マッソントリクローム染色および免疫組織化学染色(CD3・CD5・CD79 $\alpha$ ・TdT)を実施した。さらに、簡易キットを用いたBLV抗体価検査およびBLVプロウイルスをターゲットとしたPCR検査(血液・肝臓・腎臓・内腸骨リンパ節・耳下腺リンパ節)を実施した。

**材料と方法**

【材料】 血液、リンパ節、主要臓器、胸骨骨髓

【方法】

- 塗抹標本: ディクティック染色(DQ), 免疫染色
- 組織標本: HE, マッソントリクローム(MT), 鍍銀染色, 免疫染色 他
- PCR検査: BLVプロウイルス (Fechner *et al.*)
- BLV抗体価検査(簡易アッセイキット)

免疫染色抗体

B細胞	CD79 $\alpha$	B-1細胞	CD5
T細胞	CD3	B.T前駆細胞核	TdT

図1 材料と方法

## 2 結果

### (1) 肉眼所見

解体検査にて、リンパ節(頭部・肝臓・腸間膜・肺・内腸骨)の腫大を認めたほか、肝臓は白色調をおびて腫大しており、断面はモザイク状斑紋を呈していた。さらに腎臓に白色結節を認めた。骨髓には異常は認めなかった。(図2)



図2 肉眼所見

### (2) 抗体価検査・PCR検査

本症例は、BLV抗体価陰性、PCR検査も陰性であった。

(3) 細胞診

血液塗抹では、異型をともなうリンパ球様細胞が多数認められた。腫大リンパ節では、核網工が繊細で1から数個の核小体を持ったリンパ芽球様の細胞が多数認められた。同様の形態を有する細胞の多くがCD79α陽性のB細胞であった。(図3)

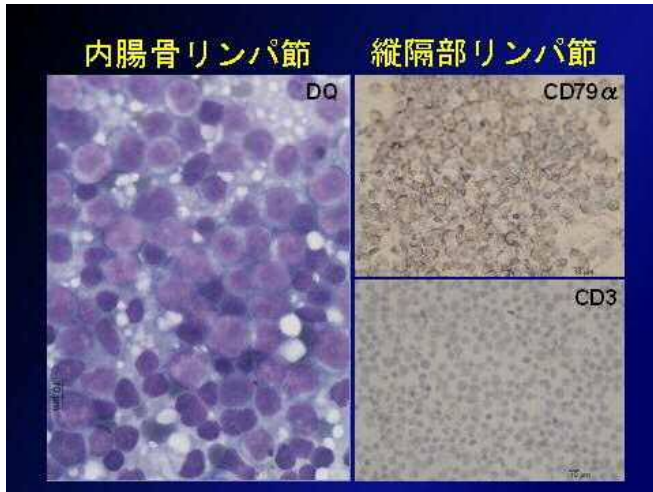


図3 リンパ節細胞診

(4) 病理組織学的検査

脾臓では、多数の巨核球を伴った髄外造血とヘモジデリンの沈着、脾洞の拡張が認められたが、基本的な組織構造は維持されていた。免疫染色の結果からも、細胞数や細胞分布に異常は見られなかった。(図4, 5)

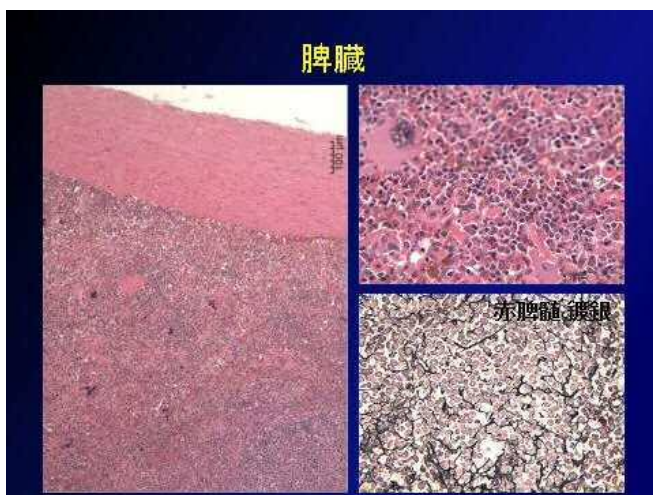


図4 脾臓組織所見

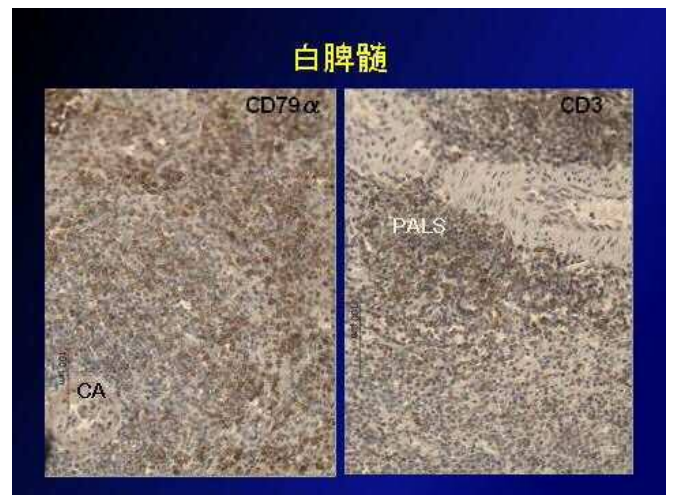


図5

内腸骨リンパ節では、リンパ芽球様細胞は、中型から大型の異型核を有しており、多数の核分裂像を伴ってび慢性に浸潤していた。巨核球をともなう髄外造血もみられた。髄外造血は小腸粘膜固有層でも認められた。(図6)

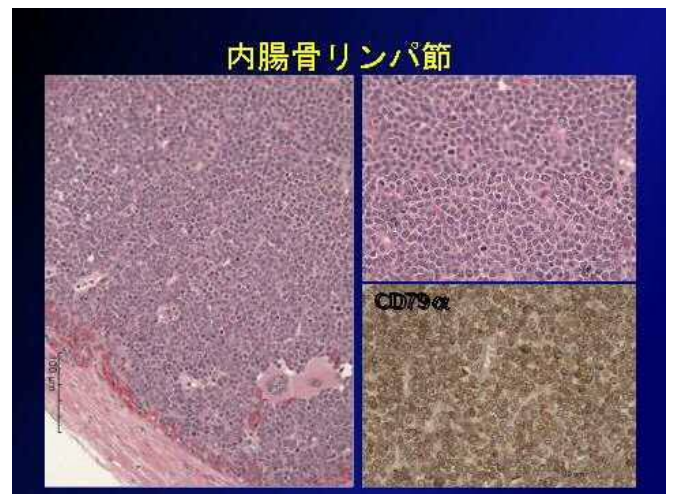


図6 内腸骨リンパ節組織所見



腎臓では、間質の主に血管周囲に同様の細胞が浸潤しており、血管周囲の結合組織は腫瘍細胞に破壊されているように見えた。静脈腔内にもリンパ芽球様細胞がみられたが、数は少なかった。(図7)

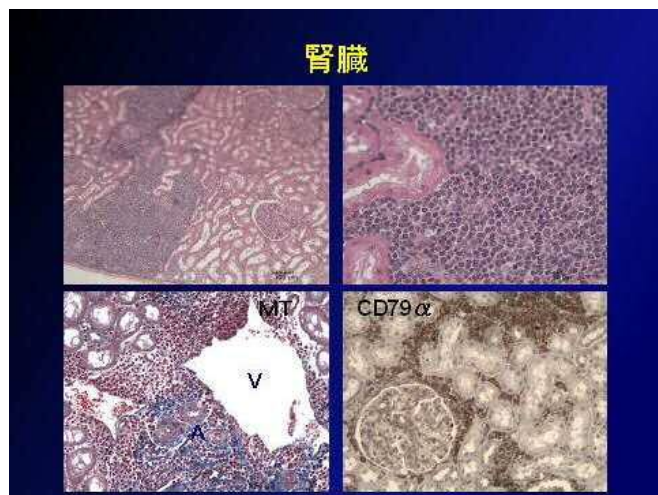


図7 腎臓組織所見

骨髄ではCD79α陽性細胞は認められず、顆粒球系細胞を主体とした造血細胞の変性・壊死とそれともなうマクロファージの浸潤、軽度線維化が認められた。(図9)

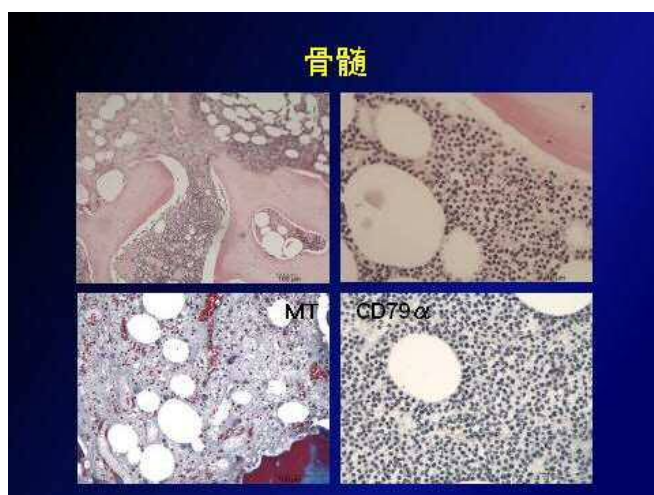


図9 骨髄組織所見

肝臓では、主にグリソン囊・グリソン鞘・門脈域に同様の細胞が浸潤しており、一部類洞内にも認められた。グリソン鞘の血管周囲の結合組織は破壊されており、グリソン囊では線維間にも腫瘍細胞が浸潤していた。(図8)

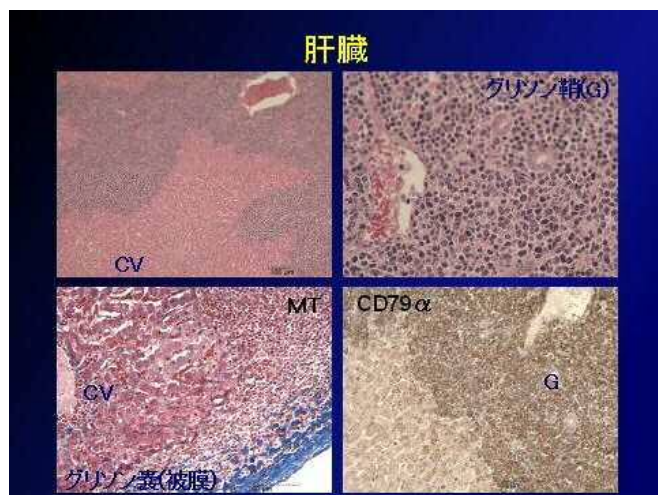


図8 肝臓組織所見

肺では胸膜付近の一部リンパ管に核分裂像をともなうリンパ芽球様細胞がみられたが、小葉内への浸潤は認められなかった。(図10)

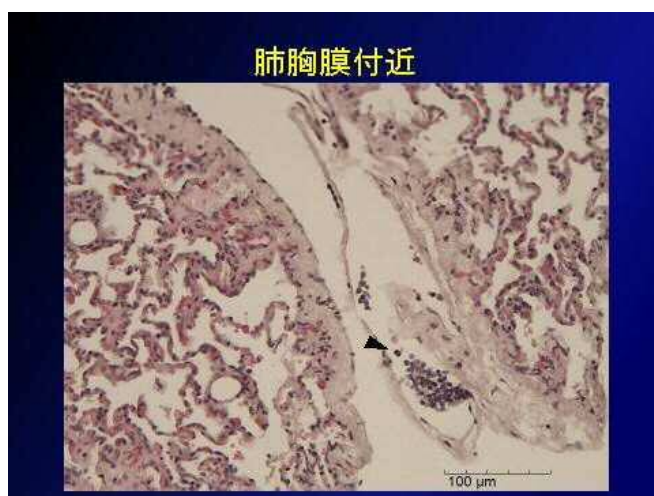


図10 肺組織所見

### 3 考 察

皮膚型T細胞をCD3の陽性コントロール、成牛型B-1細胞をCD5の陽性コントロールおよびTdTの陰性コントロールとして用い、免疫染色結果の比較をおこなったところ、本症例のリン芽球様細胞は、CD79 $\alpha$ 陽性、CD3・CD5は陰性であった。

幼弱リンパ球で発現するTdTも陽性を示したが、陰性コントロールとして用いた成牛型B-1細胞でも反応が見られたため、結果を保留とした。(図11)

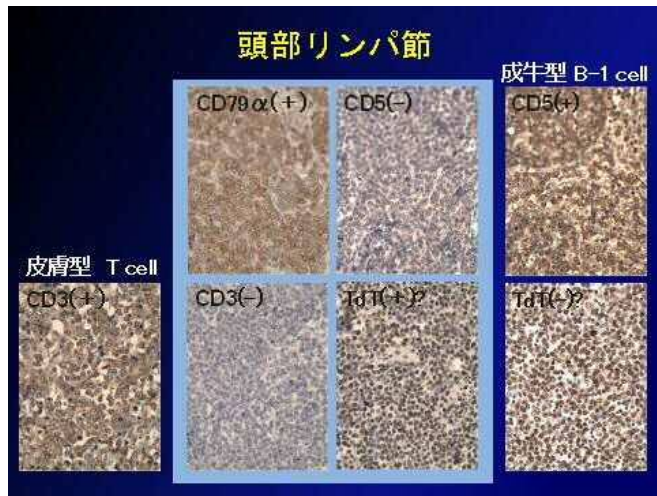


図11 免疫組織化学染色

本症例は、BLV抗体価が陰性で、プロウイルスも検出されず、リン芽球様細胞がCD79 $\alpha$ 陽性、CD5陰性を示したため、B-2細胞性リンパ腫と診断した。

(図12)



図12 診断

TdTによる免疫染色結果と保留としたため、本症例のB-2細胞が幼弱なものかどうかについては不明であるが、月齢を除くと子牛型の範疇に入るのではないかと考えられた。

血管腔内への腫瘍細胞の浸潤があまりみられず、血管腔内への集簇が強いことから、肝臓および腎臓へはリンパ行性に転移したと考えられる。

特徴的であった髓外造血の多発については、原因は不明であるが、骨髄の機能不全によるものと考えられる。

今回はBLVが陰性であったため、比較的単純な構図で検索を進めることが可能であったが、BLV陽性牛でリンパ腫を疑う場合、組織学的な検索を行わないと、BLVが関与しないその他のリンパ腫まで、成牛型と判断される恐れがあるため、注意が必要である。(図13)

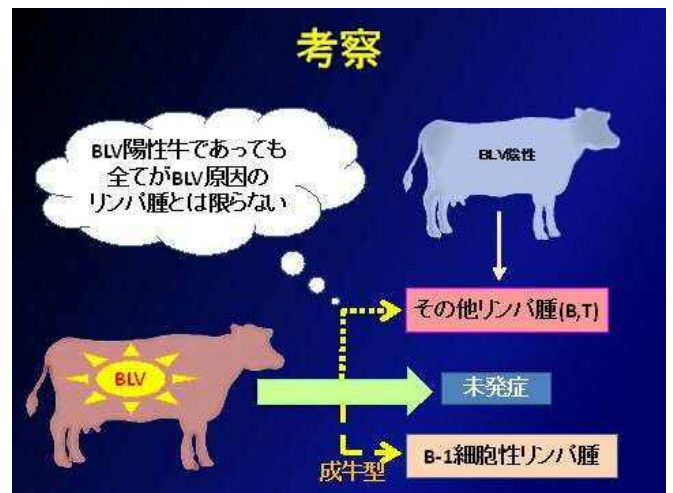


図13 考察