

生食用食鳥肉加工工程における細菌汚染実態調査

小林 直樹, 向井 猛, 山田 耕一, 徳田 祐二, 平田 甲太郎¹⁾, 黒江 宥治¹⁾
 知覧食肉衛生検査所, ¹⁾ 加世田保健所

はじめに

「鳥刺し」は鹿児島県の食文化であり、幅広い世代の県民に食されている郷土料理である。本県では、この生食用食鳥肉の安全確保を目的とした「衛生基準」を設け、食中毒発生防止のため関係業者への周知・指導を徹底している。今回、当所管轄大規模食鳥処理場に隣接する生食用食鳥肉加工施設において細菌汚染実態調査を行ったので、その結果を報告する。

材料及び方法

調査は平成29年5月に実施した。調査スケジュールとして、加工工程の食鳥肉検査及び作業環境検査を行い、それらのデータを基に、保健所合同で施設衛生監視指導を実施し、その後、指導効果の検証として、2回目の加工工程の検査を行った（図1）。

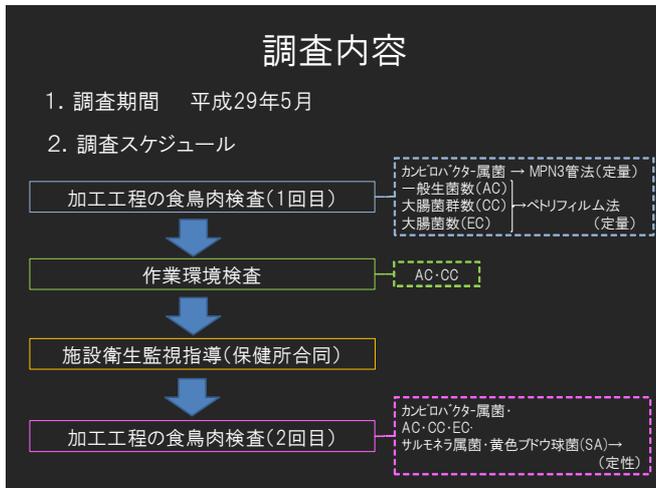


図1

生食用食鳥肉（タタキ製品）の加工工程では、大規模食鳥処理場から原料が搬入、冷蔵保管され（ダーティ）、次にボイルあるいは焼烙処理により表面加熱される（グレー）。その後、カットエリアで真空冷却、冷蔵保管、検品、スライサーによるスライス、冷蔵保管、盛り付け・包装（クリーン）され、出荷される（図2）。

加工工程の食鳥肉検査では、当日処理された同一農場由来のムネ肉、モモ肉の「原料搬入、ボイル及



図2



図3

び焼烙、冷蔵保管、スライス、包装」の各工程からそれぞれ3検体ずつ採材した（図3）。

食鳥肉検体は、表面を深さ5～10mm程度で切り出し、25gをプレート培地225mlへ入れ、ストマッキング後、カンピロバクターMPN3管法に供した。また、同様に切り出した10gを滅菌生理食塩水90mlへ入れ、ストマッキング後、一般生菌数（AC）、大腸菌群数（CC）、大腸菌（EC）、サルモネラ（Sal）、黄色ブドウ球菌（SA）の検査に供した（図4）。

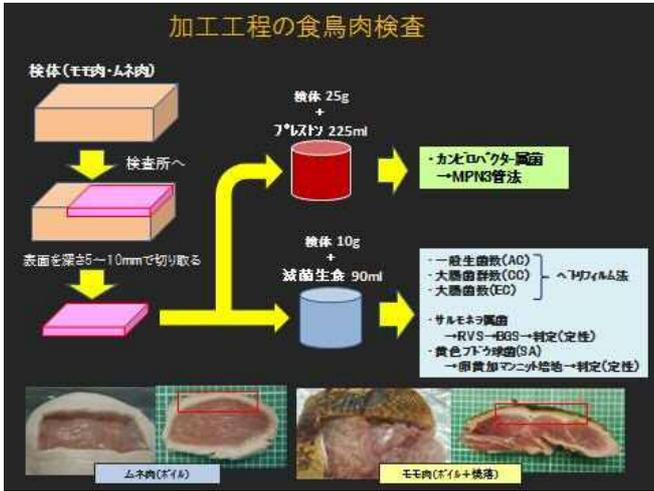


図4

作業環境検査では、製品への汚染が懸念されるドアブ、保管容器、薬味、まな板など 31 検体を拭き取り、AC及びCCの検査に供した。

結果

1回目の加工工程の食鳥肉検査の結果では、ACは「ムネ肉のスライス後」と、「モモ肉の製品及びネギトッピング製品」で高い値となった。CCは、ムネ肉、モモ肉ともに原料が最も高い値で、「モモ肉のネギトッピング製品」からも、原料と同程度の高い検出が一件認められた（図5）。ECは、原料からのみ検出され、表面加熱工程以降の検出はなかった。カンピロバクターは、ムネ肉、モモ肉共に検出されなかった（図6）。

作業環境検査の結果では、ACは「原料冷蔵庫のドアブ」で 1.7×10^7 cfu/cm²と最も高く、次いで「薬味ネギ」が 2.1×10^5 cfu/gであった。その他は、0～ 10^4 cfu/cm²であった。CCは、ドアブ3カ所から検出され、高い数値で0.7cfu/cm²であった（図7）。

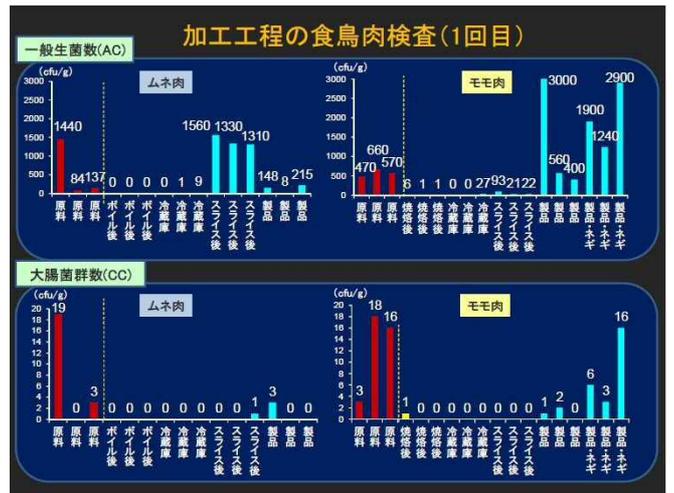


図5

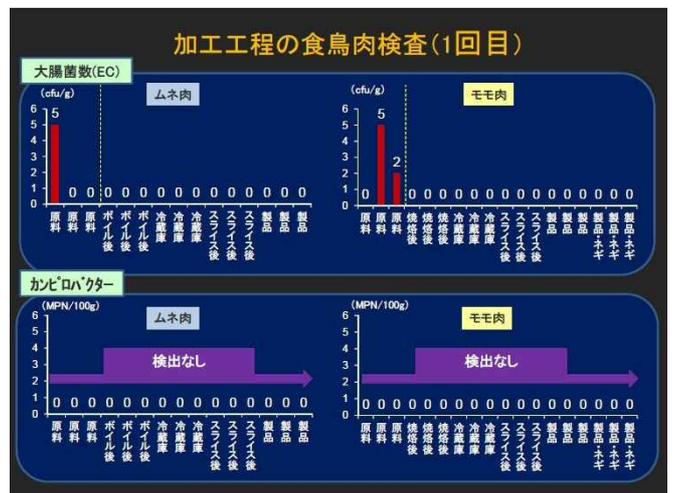


図6

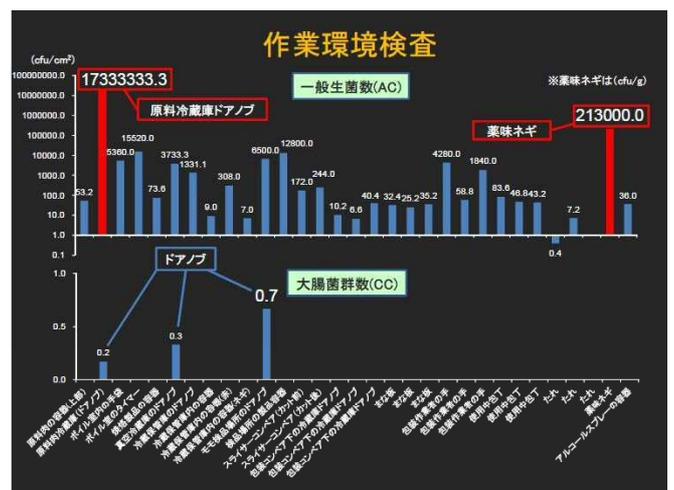


図7

施設衛生監視指導は、加工工程の食鳥肉検査および作業環境検査から得られたデータを基に、「ボイル時の容器の取り扱い」や「焼烙工程での作業による交差汚染」「ドアノブ接触後の製品の取り扱い」「薬味ネギの取扱い」など、作業による製品の取り扱いを中心としたソフト面の指導となった（図8）。



図8

衛生指導後に行った2回目の食鳥肉検査結果では、ACにおいて、手指消毒のSSOPを改善したところ、細菌数の減少が認められた。「モモ肉のネギトッピング製品」についても、ネギ処理のSSOPを改善したところ、細菌数が減少した（図9）。CCもACと同様に細菌数が減少した（図10）。ECは、1、2回目共に、原料からのみ検出されたが、表面加熱工程以降の検出はなかった（図11）。カンピロバクターは、1回目はムネ肉、モモ肉ともに検出されなかった。2回目は原料から、36~2400 MPN/100gの検出があったが、表面加熱工程以降は検出されなかった（図12）。

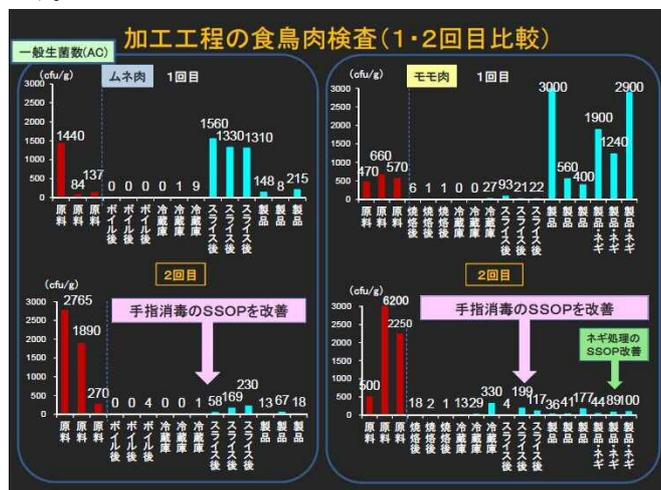


図9

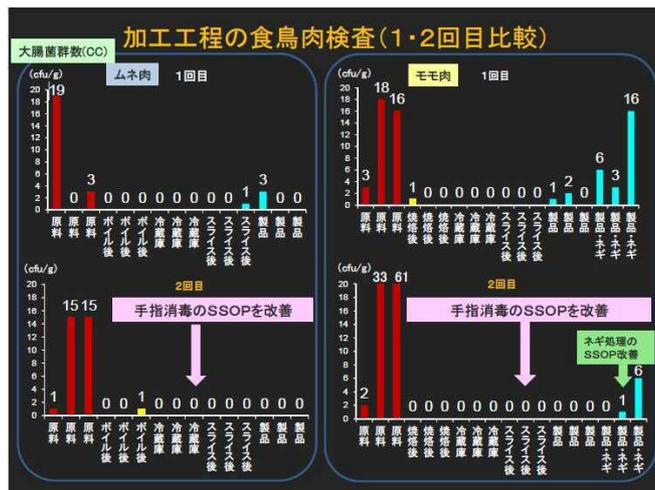


図10

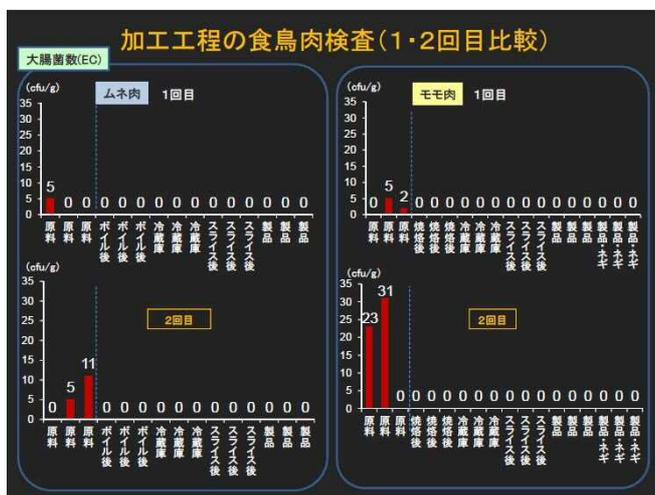


図11

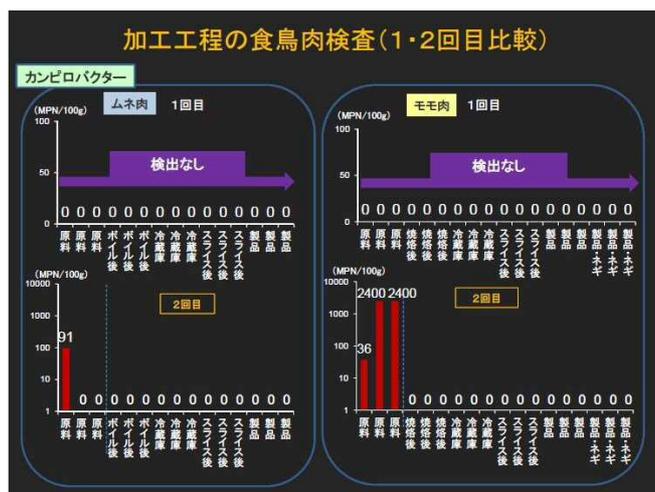


図12

なお、2回目の食鳥肉検査で実施したSalは、ムネ肉、モモ肉ともに検出されなかった。また、SAは原料からの検出はあったが、表面加熱工程以降の検出はなかった。

今回実施した調査において、本県の「生食用食鳥肉の成分規格目標」で陰性と定めている細菌について、原料からカンピロバクター、EC、SAの検出を認めましたが、表面加熱工程以降はこれらの細菌が検出されないことが確認できた（図13）。

まとめ

本調査では、食鳥肉原料から「生食用食鳥肉の成分規格目標」にあるカンピロバクター、EC、SAが検出されたが、現行のボイルあるいは焼烙といった表面加熱工程以降は検出されなくなった。よって、表面加熱工程は、生食用食鳥肉の安全確保において重要なポイントであることが確認できた。一方、ACとCCが表面加熱工程以降においても増加していた。そこで、作業環境検査の結果から工程上の微生物学的危害を分析し、それを基にソフト面を中心とした監視指導を行ったところ、最終製品の衛生が向上した。また、当該施設は、HACCP導入に向け、スタート段階にあることから、本調査で得られた細菌検査結果は、施設の微生物学的危害の分析に活用できるものであり、今後、検査所が行う指導の一助となると考える。

「生食用食鳥肉の成分規格目標」のカンピロバクター・EC・Sal・SAのまとめ

ムネ肉	カンピロバクター		大腸菌 (EC)		サルモネラ (Sal)	黄色ブドウ 球菌 (SA)	モモ肉	カンピロバクター		大腸菌 (EC)		サルモネラ (Sal)	黄色ブドウ 球菌 (SA)
	1回目	2回目	1回目	2回目				1回目	2回目	1回目	2回目		
原料	—	91	5	—	—	—	原料	—	38	—	23	—	+
ボイル	—	—	—	—	—	—	ボイル+ 焼烙後	—	2400	5	31	—	+
冷蔵庫	—	—	—	—	—	—	冷蔵庫	—	2400	2	—	—	—
スライス	—	—	—	—	—	—	スライス	—	—	—	—	—	—
製品	—	—	—	—	—	—	製品	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	製品 (ムネ)	—	—	—	—	—	—

図13

大規模食鳥処理場におけるカンピロバクター等の微生物汚染の調査とその対策 ～厚生労働省「亜塩素酸水処理による微生物低減策の有効性実証事業」～

佐々木恭子, 向井猛, 馬場希, 藤川仁美, 徳田祐二
知覧食肉衛生検査所

はじめに

食鳥処理場におけるカンピロバクター対策は、安全で衛生的な食鳥肉を供給するため必要不可欠であり、厚生労働省は平成28年度に4県5ヵ所の食鳥処理場において微生物汚染対策に有効な殺菌料及び処理方法について検討し始めた。

そこで、本所では、有機物が存在下でも安定し殺菌力が持続するといわれている「亜塩素酸水（以下、亜水）」について、大規模食鳥処理場の中抜き工程で微生物汚染低減を試みた。また、同時に各処理工程における微生物汚染の状況を調査し衛生対策に取り組んだので報告する。

材料及び方法

【実証試験】

検査材料は平成28年9月～11月に処理場へ搬入・処理された採卵鶏40羽について、脱羽後及び中抜き後と体に対して約380ppm亜水を一定量噴霧した群を「亜水群」、同条件で飲用水を噴霧した群を「対照群」とし、各試験毎にそれぞれ5検体、計4回実施した（図1）。

実証試験 概要

○噴霧方法

亜水（約380ppm）噴霧	⇒	亜水群	5検体
飲用水 噴霧	⇒	対照群	5検体

① シャワー状噴霧（80秒 約1ℓ）
② ミスト状噴霧（60秒 約45ml）
③ シャワー状噴霧（60秒 1ℓ弱）に続き
エアロゾル状噴霧（120秒 約90ml）

※ 殺菌効果の持続性を確認するため、チラー処理せず
室温20℃以下、噴霧後30分経過後の検体

○検査材料

平成28年9月～11月 4回
管内処理場に搬入された採卵鶏（処理羽数 約24,000羽/日）
脱羽後および中抜き後と体胸部
噴霧前A 噴霧後B チラー後/噴霧後30分C

図1 実証試験の概要

各試験は食鳥処理ラインを止めた状態で実施し、まず、シャワー状噴霧（以下、シャワー）として手作業により80秒間で約1ℓを噴霧する方法を試みた。次に、ミスト状噴霧（以下、ミスト）として既存のと体洗浄機にノズルを固定しビニールで周囲を覆った状態で60秒間で約45mlを噴霧する方法を試みた。さらに、エアロゾル状噴霧（以下、エアロゾル）と

して試験室で装置を組み立てて120秒間で約90mlを噴霧する方法を試みた（図2）。



図2 噴霧の様子

試験設定及び採材は、シャワーでは中抜き後を噴霧前A、内外洗浄後を噴霧後B、チラーを通過した後をチラー後Cとし、それぞれの時点で同一と体の左胸部表面25cm²を滅菌リン酸緩衝生理食塩水で拭き取った。

なお、亜水噴霧後及びチラー処理直後の検体は、0.002mol/lチオ硫酸ナトリウムを添加した。

ミストでは、内外洗浄前を噴霧後Bとし、噴霧前A及びチラー後Cはシャワーと同一時点を同様に拭き取った。

シャワー状噴霧に続きエアロゾル状噴霧を実施した試験（以下、シャワー+エアロゾル）では、中抜き前を噴霧前A、2回噴霧後を噴霧後Bとし、

亜水の殺菌効果の持続性を確認するため、チラーを
通さず室温（20℃以下）で30分間感作させた検体を
噴霧後30分Cとし、同様に拭き取った（表1）。

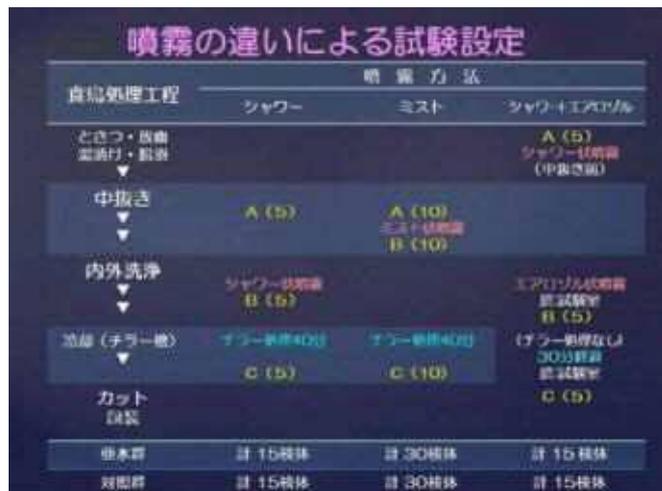


表1 噴霧の違いによる試験設定

検査方法は、一般生菌数（以下，AC），大腸菌
群数（以下，CC）及びカンピロバクター属菌MPN
値（以下，*C. jejuni/coli*）を定法に従い測定し、
各群の平均値における減少率を比較し、亜水の低減
効果を評価した。

【衛生対策】

検査材料は、平成28年7月～平成29年5月の5回
にわたり搬入・処理された採卵鶏49羽について脱羽
後、チラー前及びチラー後で抽出した食鳥と体胸部
を3検体（一部5検体）拭き取った。機械の検査は、
総排泄腔切除機（以下、ベントカッター）、開腹機、
中抜き機及び肺取り機の4ヶ所について、と体が接触
する部分を稼働後に水洗しラインを止めた状態で、
各3検体同様に拭き取った。



図3 食鳥処理工程

検査方法は、と体胸部及び機械のと体接触面を
それぞれ25cm²拭き取り、AC、CC及び*C. jejuni/*
*coli*を定法に従い測定し、これらの結果を基に、
処理場が従来から取り組んでいる機械設備の清掃や
管理について再確認し、衛生対策について指導した。

なお、チラー後と体及び機械はカンピロバクテ
ー属菌は定性試験とした（図3）。

結果

【実証試験】

各噴霧条件におけるAC平均値は、シャワーで噴
霧直後に最も低下し約1/5となったが、何れの条件
においても対照群と同レベルであった。また、シャ
ワー+エアロゾルでは2回噴霧したにもかかわらず
噴霧直後に増加した（図4）。



図4 各噴霧条件におけるAC平均の推移

CCの平均値は、ミストで噴霧直後に最も低下し
約1/10となったが、AC同様、何れの条件でも対照
群と同レベルであり、シャワー+エアロゾルでは、

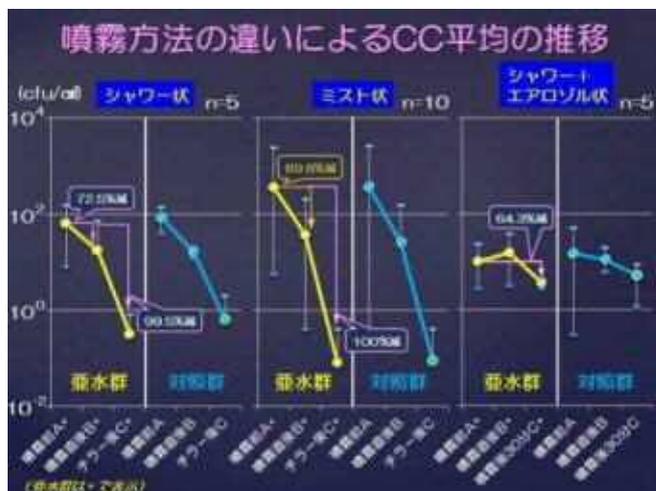


図5 各噴霧条件におけるCC平均の推移

噴霧直後に増加した。(図5)

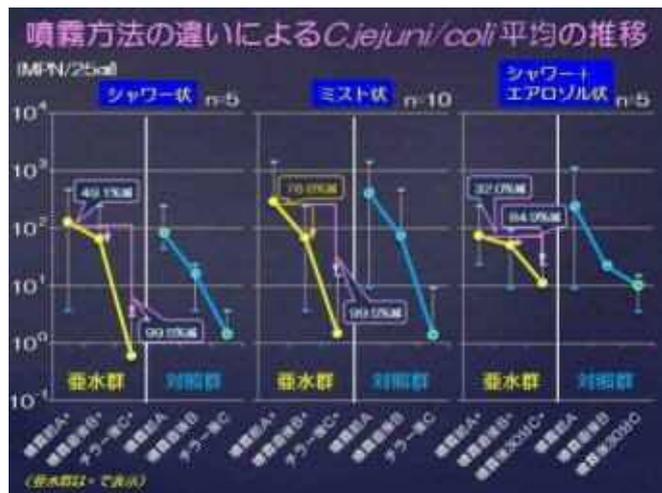


図6 各噴霧条件におけるC.jejuni/coli平均の推移

C. jejuni/coli 平均値では、ミストで噴霧直後に最も低下し約1/5となったが、AC及びCC同様、何れの条件でも対照群と同レベルであった。(図6)。

【衛生対策】

衛生対策前後における食鳥と体のACは、脱羽後及びチラー前では明らかな変動が認められなかったものの、チラー処理の対策によりチラー後が減少傾向となった(図7)。



図7 衛生対策前後におけるACの推移

CCは、湯漬け及びチラー処理の対策により脱羽後及びチラー前が1/10以下となり、チラー後ではほとんど検出されなくなった(図8)。

C. jejuni/coli は、湯漬け及びチラー処理の対策を講じた後にもかかわらず、2回目の検査で高率に検出されたが、それ以降は脱羽後の多くが1/10以下となり、チラー後では検出されなくなった(図9)。

稼働中の機械における各菌数については、自動洗

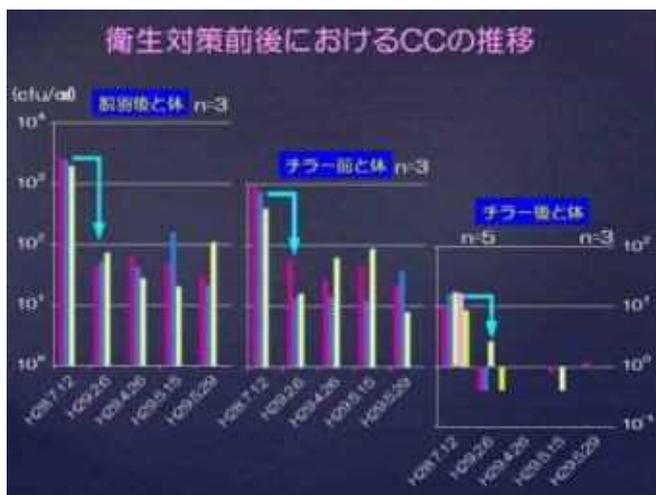


図8 衛生対策前後におけるCCの推移



図9 衛生対策前後におけるC.jejuni/coli の推移



図10 機械の各種菌数の推移

浄の見直し等の対策を図ったが、ベントカッターでAC及びCCが他の機械より高く、C. jejuni/coli は5回とも検出された(図10)。

考察

実証試験では、まず中抜き室で亜水噴霧を試みたが、シャワー及びミストとも噴霧直後の各種菌数が対照群と同程度で減少したため、「亜水自体の効果」は確認できなかった。また、チラー後も全菌数が低減したものの、CC及び*C. jejuni/coli* は検出率が低く、ACでは対照群と同程度であり、亜水効果によるものか、チラー処理によるものか評価できなかった。

次に、シャワー＋エアロゾルの持続性試験では、2回噴霧後に30分間感作させたが、対照群と同程度であり、「殺菌効果の持続性」についても確認することができなかった。

亜水効果を明確にできなかった要因として、亜水噴霧の基礎データが少なかつたこと、実際の処理場内では制約が多く試験設定が難しかったことなどが考えられた。

また、2回噴霧にもかかわらず、AC及びCCが逆に増加した原因として、処理場内での二次汚染が考えられた。そこで、亜水効果を正確に把握するためには汚染対策が必要と考え、処理場とともに、各処理工程における衛生対策に取り組んだ。

衛生対策では、脱羽室で湯漬槽の清掃見直し及び毛焼きバーナーの交換などの対策を講じたところ、脱羽後と体のCC及び*C. jejuni/coli* の低減につながった。また、チラー槽の透視度や残留塩素濃度について管理の適正化を図ったところ、チラー後と体のACが減少傾向となり、CC及び*C. jejuni/coli* がほとんど検出されなくなった。これらのことから、中抜き室内で食鳥と体の菌数を低い状態で維持することができれば、チラー後と体の菌数を低減できることが示唆された。

処理場では、稼働中機械の結果から、更なる二次汚染の軽減に向けて、中抜き室の衛生対策に取り組むとともに、亜水の有効性についても継続して調査しているところである。

検査所では、各処理工程のデータを活用しながら、今後も処理場の自主衛生管理が向上するよう助言していきたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省「平成24年8月24日薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会添加物部会」亜塩素酸水の食品添加物の指定に関する添加物部会報告書(案)【報告資料2-1】2012

牛の原発不明腺癌の1例

祝迫翔子 東山崎達生 川畑仁志 一二三達郎¹⁾ 畑井仁¹⁾ 三好宣彰¹⁾ 福里吉文
鹿屋食肉衛生検査所 1) 鹿児島大学共同獣医学部組織病理学研究室

はじめに

と畜検査で見られる牛の腫瘍症例は牛白血病によるものが多いが、それ以外の腫瘍の発生は少ない。今回、管内と畜場において、牛のと畜検査時に全身性腫瘍が認められ、病理組織学的検索の結果、腺癌の全身転移と診断した症例の概要について報告する。

材料と方法

症例は、牛、黒毛和種(雌、139ヵ月齢)で、削瘦と水様性下痢を主訴として臨床獣医師によって予後不良と診断され、管内と畜場に病畜として搬入された。生体検査時にも削瘦および水様便を認めた。

材料として、結腸、肺、肝臓、腫大したリンパ節を採材し、スタンプ標本を作製し、Diff-Quik染色を行った。また、10%中性ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋切片を作製し、定法によりHE染色を行った。併せて、各種サイトケラチン(CK AE1/AE3, CK7, CK20), S-100蛋白質, シナプトフィジン, クロモグラニンAに対する抗体を用いた免疫組織化学的検索を実施した。さらに、牛白血病との鑑別のため、ウイルス学的検査として、肺、肝臓、腎臓、縦隔リンパ節、子宮を材料とし、PCR法によるBLVプロウイルスの検出を実施した。

結果

(1) 解体所見

解体後検査では結腸の一部は肥厚し、さらに漿膜の広範囲に及ぶ水腫が認められた[図1, 2]。肝臓および肺において米粒大から空豆大の乳白色結節が多数認められ[図3, 4]、複数のリンパ節(肺門、縦隔、内腸骨)が腫大していた。



図1 漿膜の水腫

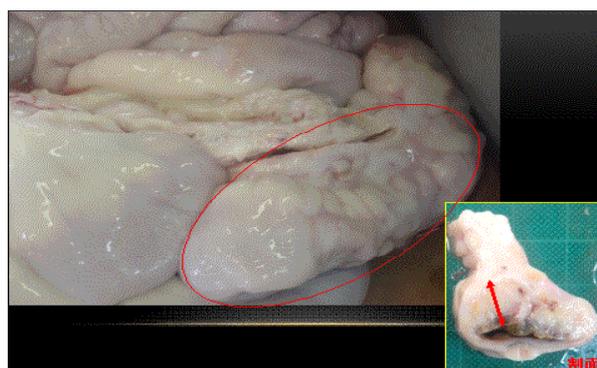


図2 結腸の一部肥厚

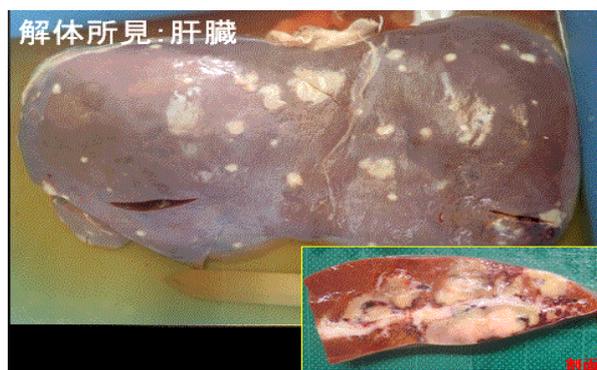


図3 肝臓

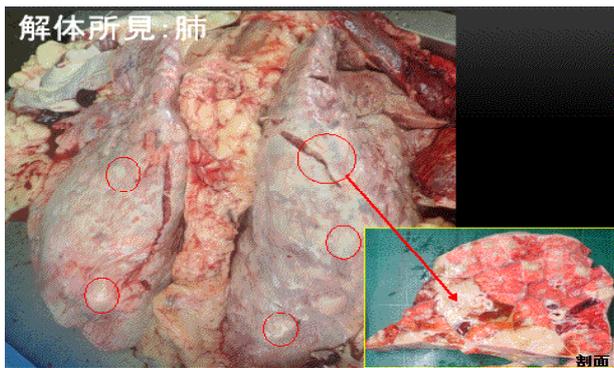


図4 肺

結腸，肝臓，肺に形成された腫瘍の断面はいずれも乳白色充実性であった。

(2)細胞診所見

スタンプ標本では異型リンパ球は認められなかった。

(3)病理組織学的検索

病理組織学的検索において，結腸の粘膜から筋層において腺上皮由来腫瘍細胞が浸潤性に増殖していた。腫瘍細胞は核小体明瞭で類円形核と立方状から円柱状，あるいは多角形の細胞質を有し，管状や充実性に増殖していた[図5]。核の大小不同と異型性は強く，核分裂像は著しく多かった[図6]。

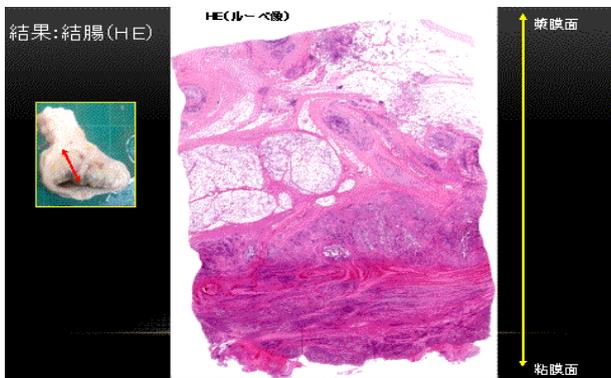


図5 結腸 (HE 染色) ルーペ像

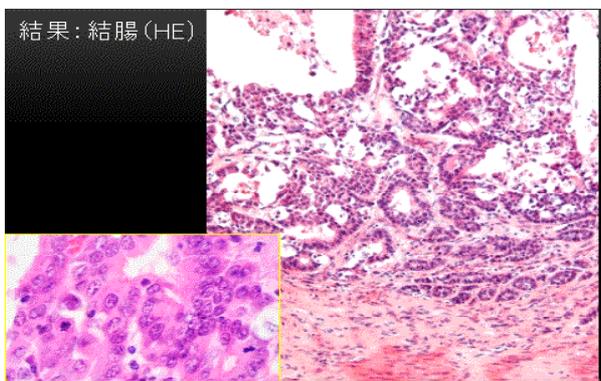


図6 結腸 (HE 染色) 強拡大

肝臓，肺，全身諸リンパ節においても同様の腫瘍細胞の増殖が認められた。

(4)免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索では，腫瘍細胞はCK AE1/AE3に陽性を示し[図7]，CK7，CK20，S-100蛋白質，シナプトフィジン，クロモグラニンAに少数の細胞が陽性を示した。

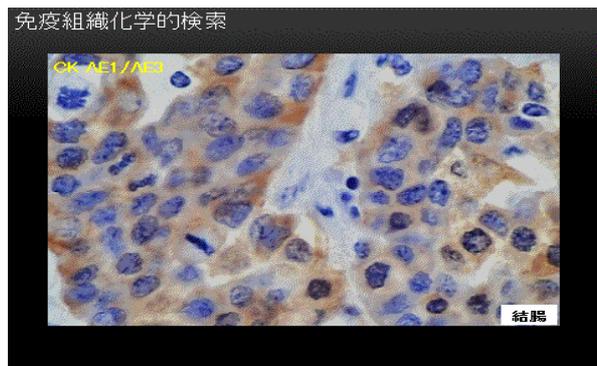


図7 結腸 (CK AE1/AE3)

(5)ウイルス学的検査

ウイルス学的検査で，検体いずれからもBLVプロウイルス遺伝子は検出されなかった。

考 察

病理組織学的検査および免疫組織化学的検査の結果，腫瘍細胞は管腔構造を形成する上皮系細胞からなる悪性腫瘍であったことから腺癌と診断した。

肉眼および組織所見より本症例は全身性腫瘍と判定し全部廃棄処分となった。

腫瘍が散在していた肺，肝臓については比較的均一な大きさの腫瘍が全域に散在していたことから，転移巣と考えられた。牛の腺癌では子宮腺癌の転移が好発するが[1, 2]今回は子宮に著変は認めなかったため，各所見から原発部位として結腸が疑われた。

そこで結腸の粘膜上皮細胞を由来とする可能性[図8, 9]について各種免疫組織化学的検索を実施したところ神経系マーカーのS-100蛋白質，シナプトフィジン，クロモグラニンAは陽性とは判別できず神経内分泌癌は否定された。

しかし，上皮系マーカーのCK7，CK20についても陽性と判定できず，腫瘍細胞の起源については特定に至らなかった。



図 8 腸腫瘍 鑑別

考察

CK7/CK20の染色特性による腫瘍細胞の鑑別

	CK 20 (+)	CK 20 (-)
CK 7(+)	腺癌 胆道系癌	肺非小細胞癌 (扁平上皮癌除く)
CK 7(-)	大腸/直腸癌 胃/十二指腸/ 小腸癌	肺小細胞癌 肺扁平上皮癌 肝細胞癌

※ヒトの場合

図 9 CK7/CK20 の染色特性による腫瘍細胞の鑑別

通常と畜検査では、消化管すべてを切開する検査は実施しておらず本症例においても消化管すべて切開していないため結腸以外に原発巣が存在していた可能性も否定できない。

今後は、検査時に全身性腫瘍が疑われた場合原発部位には様々な可能性があることを想定し、十分な採材と詳細な組織検索を考慮する必要があると思われた。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導とご助言を賜りました鹿児島大学協同獣医学部組織病理学研究室の三好宣彰先生、畑井仁先生、一二三達郎先生に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- [1]大久保英子, 岡田洋之, 千早豊, 松川清:ウシにみられた体腔内播種性転移腺癌の2例, 日獣会誌, 42:64~67(1989)
- [2]日本獣医病理学会編:動物病理学各論, 307, 文永堂出版(1998)

スタンプ標本を用いた免疫組織化学的染色による 牛白血病の簡易診断法

小池仁美 岡佐由利 鹿島正文

末吉食肉衛生検査所

はじめに

牛白血病は、牛白血病ウイルス(BLV)が関与する地方病性と原因が特定されていない散发性に大別され、その診断には、血清学的検査や遺伝子検査の他、病理組織学的検査が実施される。さらに地方病性牛白血病の腫瘍細胞は、免疫組織化学的染色(以下IHC)によりBリンパ球由来のB-1a細胞とB-1b細胞に分類される。腫瘍細胞の形態観察から得られる診断的情報には限りがあり、免疫学的表現型の検索には凍結切片を用いる必要があるが実用的でない。そこで今回、牛白血病症例のスタンプ標本を用いてIHCを行い、牛白血病の簡易診断法としての応用について検討した。

背景

牛白血病は、と畜検査における全身性腫瘍のうちで最も多く認められる疾病で、家畜伝染病予防法では届出伝染性疾病に規定されており、と畜場法では全部廃棄の対象である。

近年、鹿児島県内と畜場における本疾病の摘発頭数は増加傾向にあり、加えて病態が複雑化し、従来の分類に当てはまらない症例も確認されている。

と畜検査においては、本疾病の正確かつ迅速な診断が求められており、免疫学的表現型の検索¹⁾やスタンプ標本を用いた診断が検討されている²⁾。

材料と方法

2016年2月から2017年5月に、県内3と畜場で牛白血病が疑われた黒毛和種13頭(性別:♂3頭♀10頭,月齢:25~178カ月齢)を検査対象とした。

【スタンプ標本作製】

氷冷した腫瘍病変材料を用いて壊死や出血を避けるようにトリミングし、濾紙などで余分な血液や体液を除去後、剥離防止コートスライドグラスに細胞が集塊状とならないようスタンプした。素早く冷風にて乾燥後、100%アセトンで室温10分間浸漬固定し標本として用いた。

【病理組織学的検査】

全検体のスタンプ部位から常法に従いパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色後、腫瘍細胞の形態学的観察を行った。

【免疫組織化学的検査(IHC)】

全検体のパラフィン包埋切片及びスタンプ標本、6頭の凍結切片について、ポリマー法(ImmPRESSTM REAGENT Anti-Mouse Ig, Vector Laboratories, Inc)にてIHCを実施し、AEC(AEC基質キット, PO基質, ニチレイ)にて発色させ免疫学的表現型を検索した。

パラフィン包埋切片では、一次抗体として抗ヒトCD79 α cy抗体(B細胞, マウスモノクローナル, HM57, $\times 120$), 抗ヒトCD3抗体(T細胞, マウスモノクローナル, F7.2.38, $\times 120$), 抗ヒトCD68抗体(マウスモノクローナル, EBM11, $\times 50$)を用いた。

スタンプ標本及び凍結切片では、前述抗体に加えて、抗ウシCD5抗体(胸腺細胞, マウスモノクローナル, CC17, $\times 50$), 抗ウシCD11b抗体(マウスモノクローナル, NM10A, $\times 25$), 抗ウシCD4抗体(T細胞, マウスモノクローナル, CC8, $\times 2000$), 抗ウシCD8(T細胞, マウスモノクローナル, CC63, $\times 40$), 抗ウシWC1抗体(マウスモノクローナル, IL-A29, $\times 500$), 抗ヒトTdT抗体(ウサギモノクローナル, EP266, $\times 100$)を用いた。

パラフィン包埋切片における抗原賦活化として、CD79 α 及びCD3では、TE液(pH9.0)に浸漬しオートクレーブにて121 $^{\circ}$ C5分間熱処理を行った。また、CD68では、0.1%アクチナーゼE(科研製薬KK:100万チロジン単位/g)にて37 $^{\circ}$ C30分反応による蛋白分解処理を実施した。

【遺伝子検査】

全頭の腫瘍病変を材料とし、BLVプロウイルス遺伝子の検出(env遺伝子gp51領域を標的としたPCR検査,またはCycleave PCR Reaction Mix SP(CY510, ｶｯﾊﾞｲ)及び牛白血病ウイルス検出用Probe/Primer/Positive Control(CY415, ｶｯﾊﾞｲ)を用いたリアルタイムPCR検査)による遺伝子学的検査を実施した。

結果

【肉眼的所見】

13頭全頭で、全身リンパ節の著しい腫大、腫瘍化が見られ、うち3頭は胸腺にも腫瘍病変が認められた。その他、表1に示す様に、心臓や第4胃、子宮等、本疾病の好発部位に腫瘍病変を認めた。

表1 肉眼的病変

	月齢	リンパ節	胸腺	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	第4胃	子宮
BL-1	28	○		○	○	○	○		
BL-2	103	○		○			○	○	○
BL-3	99	○		○	○		○	○	○
BL-4	29	○			○	○			
BL-5	132	○		○				○	○
BL-6	147	○		○					
BL-7	112	○	○		○		○	○	
BL-8	104	○		○				○	
BL-9	178	○			○				
BL-10	83	○				○			
BL-11	142	○		○		○	○	○	
BL-12	25	○	○	○	○	○	○	○	
BL-13	27	○	○				○		

【病理組織学的所見】

13頭全ての腫瘍病変において、くびれや切れ込み等の異型核を有するリンパ球様腫瘍細胞の増殖が認められ、核分裂像も散見された。

B細胞性腫瘍では、小型から大型の異型性の強い腫瘍細胞が見られ、多形性を示した。一方、T細胞性腫瘍では比較的小型の腫瘍細胞が大部分を占め

た。(図1)

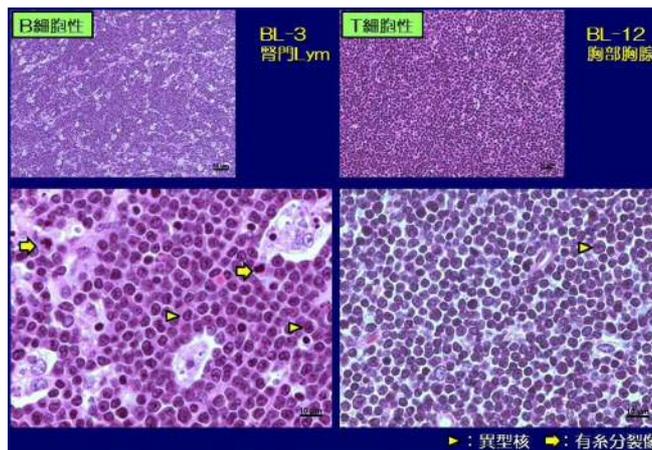


図1 病理組織学的検査結果

【免疫組織化学的所見】

スタンプ標本のIHC結果は、表2に示す通りであった。

表2 スタンプ標本 IHC結果

	CD79 α	CD5	CD11b	CD3	CD4	CD8	WC1	CD68	TdT	免疫学的表現型
BL-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	B1-b細胞
BL-8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	B1-a細胞
BL-10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	B1-b細胞
BL-11	+	-	+	-	-	-	-	-	-	B1-b細胞
BL-12	-	+	-	+	-	-	-	-	+	前駆Tリンパ芽球
BL-13	-	+	-	+	-	-	-	-	+	前駆Tリンパ芽球

11頭がCD79 α ⁺のB細胞性腫瘍であり、うち8頭の腫瘍細胞がCD5⁺CD11b⁺を示すB-1a細胞に分類された(図2)。なお、凍結切片でも同様の染色結果となった。

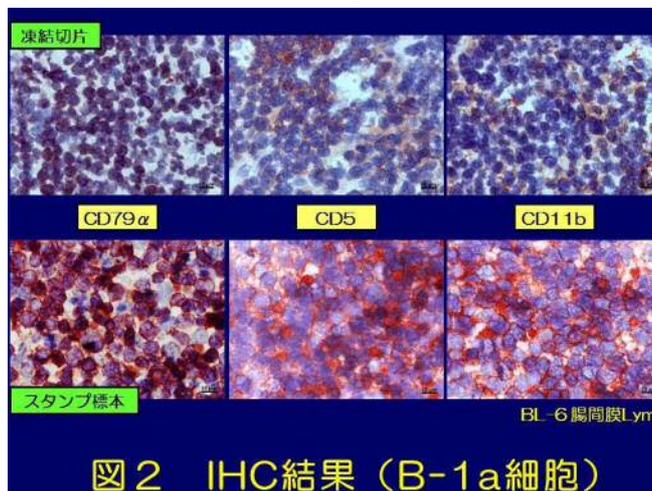


図2 IHC結果 (B-1a細胞)

B細胞性腫瘍のうち残る3頭では、スタンプに混在したT細胞がCD5+を示すものの、腫瘍細胞はCD5-CD11b+を示すB-1b細胞に分類された(図3)。なお、凍結切片でも同様の染色結果となった。

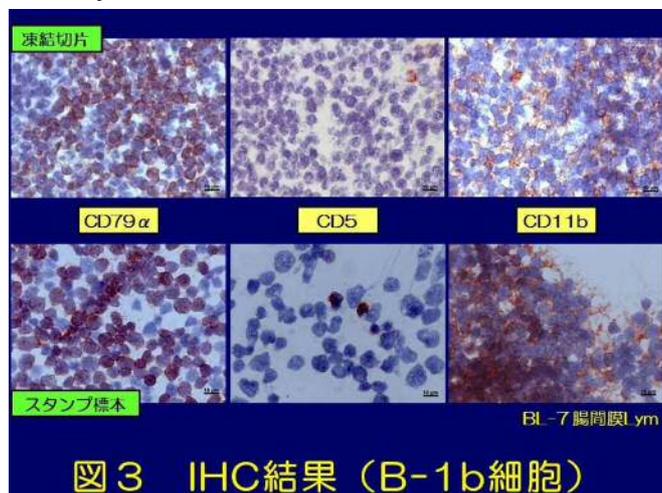


図3 IHC結果(B-1b細胞)

その他2頭は、CD3+のT細胞性腫瘍であり、CD5+TdT+を呈する前駆Tリンパ芽球性腫瘍と診断された(図4)。凍結材料との比較はできなかったが、パラフィン包埋切片との染色結果に相違はなかった。

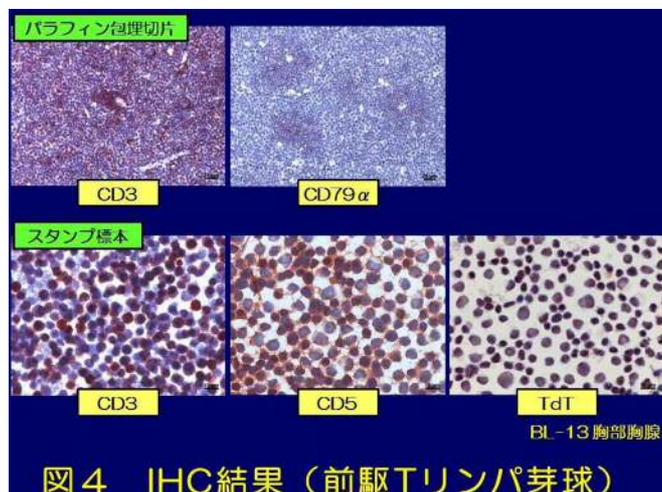


図4 IHC結果(前駆Tリンパ芽球)

各標本のIHC結果を比較したところ、今回検査を実施した13頭全てにおいて、全標本でB細胞及びT細胞の分類が一致していた。なおかつ、スタンプ標本及び凍結切片における免疫学的表現型の検索についても同様の染色性を示すことを確認した(表3)。

【BLVプロウイルス遺伝子検査】

13頭全ての検査材料から、BLVプロウイルス遺伝子が検出された(表3)。

表3 IHC結果(まとめ)及び遺伝子検査結果

	パラフィン包埋切片	スタンプ標本	凍結切片	BLV-PCR
BL-1	B	B	B1-a	+
BL-2	B	B	B1-a	+
BL-3	B	B	B1-a	+
BL-4	B	B	B1-a	+
BL-5	B	B	B1-a	+
BL-6	B	B	B1-a	+
BL-7	B	B	B1-b	+
BL-8	B	B	B1-a	+
BL-9	B	B	B1-a	+
BL-10	B	B	B1-b	+
BL-11	B	B	B1-b	+
BL-12	T	T	前駆Tリンパ芽球	+
BL-13	T	T	前駆Tリンパ芽球	+

考 察

スタンプ標本は、腫瘍組織の全体的な構造を観察できない点では凍結切片標本やパラフィン包埋切片標本に劣るが、作製が簡便であり、固定による影響が少なく、また抗原賦活化が不要であるため使用可能な抗体が多様となる利点がある。

今回の結果より、スタンプ標本における腫瘍細胞の免疫学的表現型は凍結切片標本と一致しており、牛白血病のIHCによる診断への応用が可能であることが示唆された。

ただし、スタンプ標本で診断するには、腫瘍細胞の形態やIHC結果を正確に判断する必要があり、混在する正常リンパ球との鑑別も重要となる。

また、適切な標本作製が不可欠で、腫瘍細胞が増殖しかつ壊死や出血部を避けた適切な病変部位を選定することが重要であり、作製技法にも注意すべき点が多い。

今後、さらに症例を積み重ね、診断法としての確立に努めていきたい。

謝 辞

今回、スタンプ標本作製及び免疫組織化学的染色についてご指導いただいた、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門越境性感染症研究領域暖地疾病防除ユニット長田中省吾先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 荻原晶代ら:牛白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討,日獣会誌 第67号 193～203, 2014
- 2) 末永昌美ら:スタンプ標本を用いた牛白血病における迅速診断の検討,山口獣医学雑誌 第42号 33～39, 2015

尿毒症に係る検査法の調査

松ヶ野翔 加藤良久 早田理恵 仲町康正 鹿島正文
末吉食肉衛生検査所

はじめに

尿毒症は理化学的検査において、尿素窒素及びクレアチニン値以外のデータは少なく、尿臭による官能検査は重要な判定基準であるが、検査員の嗅覚に頼る検査であり、客観性に乏しいのが現状である。2003年に本県において、筋肉中のアンモニアをガス化させ、ガス検知管を用いてアンモニア値を測定したが、安定した結果が得られなかった。そのため、本調査では、筋肉抽出溶液中のアンモニウムイオン値(以下、 NH_4^+)を測定し、数値化することによって尿臭を判定する際の一助として用いることが可能かを検討した。また、定法での筋肉中尿素窒素値(以下、MUN)測定の前処理は煩雑なため、処理法の簡易化(以下、簡易法)についても検討したのでその概要も併せて報告する。

材料と方法

2016年11月～2017年6月に実施したと畜検査において、尿毒症で廃棄処分となった牛6検体及び豚2検体の計8検体の筋肉を材料とした。

【MUN測定法】

MUNは50 ml用三角フラスコに筋肉5 g及び蒸留水20 mlを加え、アルミ箔で口を覆い、100℃水浴中で10～15分間加熱し、水で急速冷却後、ろ紙でろ過したものを試験液とし、レフロトロンにより測定した。

【 NH_4^+ 測定法】

NH_4^+ はMUN測定で得られた抽出溶液を用いてHANNA製のデジタルテスター高濃度アンモニウムイオン(淡水用)により測定した。

【MUN簡易測定法】

15 mlの遠沈管に筋肉2 gおよび蒸留水8 ml入れ、アルミブロックヒーターで100℃、約20分間濁りが無くなるまで加熱を行い、その後水で急速冷却を行い、転倒混和後、5000 rpmで3分間遠心し、その上清を試験液として用い、レフロトロンによりMUNを測定した。

結果

8検体のうち明らかな尿臭を認めた3検体において、各平均値は血液中尿素窒素値(以下、BUN)が121.3 mg/dl、MUNが86.0 mg/dl、 NH_4^+ はすべて99.9 ppmを超えた(表1)。

表1 尿臭あり結果

畜種	解体所見	性別	BUN (mg/dl)	MUN (mg/dl)	NH_4^+ (ppm)
A 牛	膀胱炎、膀胱破裂 腹膜炎	去勢	178.6	104.0	>99.9
B 牛	腎臓瘍、膀胱炎 化膿性腹膜炎	去勢	113.0	97.5	>99.9
C 牛	腎炎、白色腎 膀胱炎、膀胱結石 尿道結石	去勢	72.4	56.5	>99.9

やや尿臭を認めた2検体において、BUNが139.4 mg/dl, MUNが122.4 mg/dl, NH_4^+ が40.1 ppmであった(表 2)。

表 2 やや尿臭あり結果

畜種	解体所見	性別	BUN (mg/dl)	MUN (mg/dl)	NH_4^+ (ppm)
D 牛	腎結石、腎臓癌 膀胱炎	去勢	170.8	141.2	42.2
E 牛	腎壊死、白腎、腎臓癌 腎腫大、腎硬結 腎周囲脂肪浮腫 膀胱炎	雌	108.0	103.5	36.9

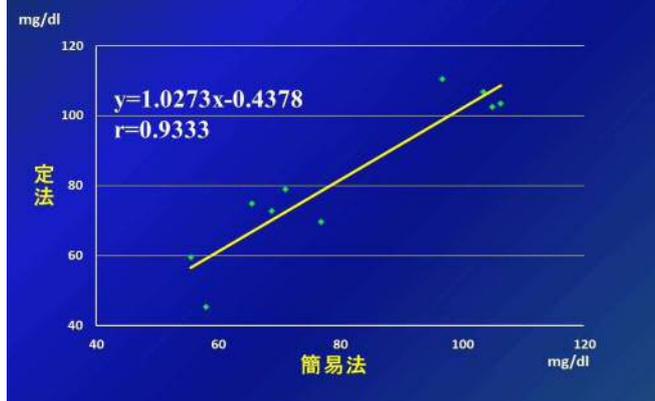
尿臭を認めなかった3検体において、BUNが118.0 mg/dl, MUNが99.2 mg/dl, NH_4^+ が20.4 ppmであった(表 3)。

表 3 尿臭なし結果

畜種	解体所見	性別	BUN (mg/dl)	MUN (mg/dl)	NH_4^+ (ppm)
F 牛	腎腫大、腎臓弱 腎周囲脂肪浮腫 膀胱炎	去勢	110.0	97.5	18.4
G 豚	腎出血、腎腫大 腎線維化、腎硬結 白腎	去勢	140.0	96.5	22.8
H 豚	腎腫大、膀胱炎	去勢	104.0	103.5	19.9

また、MUN測定における定法と簡易法の回帰直線式は $y=1.0273x-0.4378$ となり、相関係数は0.9333であった。(図 1)

図 1 簡易法結果



考察

尿毒症判定は、官能検査である尿臭の有無が最も重要な検査であるが、客観性に乏しく、検査員の主観に頼りがちなものとなりやすい。本調査では、筋肉において明らかな尿臭を認めた検体は NH_4^+ が高い傾向にあり、尿臭を認めなかった検体は NH_4^+ が低い傾向にあった。そのため、筋肉中の NH_4^+ 測定は尿臭の客観的な判断材料として用いることが可能であると考えられた。しかし、今回の調査では検体数が少なく、今後の検査に活用できるような参考値までの設定はできなかった。今後正常牛における NH_4^+ の数値や様々な尿臭の認められた検体のデータを集積し、より詳しい調査が必要である。

定法と簡易法によるMUNの測定値を比較したところ、非常に高い相関を示し、両者間で得られる数値には差が少なかった。そのため、密閉性に優れより少ない検体量で簡便に検査できる簡易法は有用であると考えられた。

ヨーネ病対応マニュアルの作成

鏡園やよい 赤坂敬史郎 肝付智文 新原政一 中島靖剛*

大口食肉衛生検査所 ※ 鹿児島県生活衛生課

はじめに

ヨーネ病は反芻動物の増殖性腸炎を特徴とする *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* による感染症で、家畜伝染病予防法では家畜伝染病に指定されている。

ヨーネ病の診断は比較的容易であるが、鹿児島県でのヨーネ病の発生は散発的で発生頭数も少ないため、と畜検査経験を持つ検査員はほとんどいない。ここ数年、実際にヨーネ病の疑いが発生した際、対応に苦慮する事例もみられたため、今回対応マニュアルの作成を試みた。

材料及び方法

平成29年5月～6月にかけて、県内7検査所、各検査員に対し、ヨーネ病発生時の対応についてのアンケート調査を行い、調査結果を集計した。調査結果をもとにマニュアルの内容と構成を検討するとともに、本県での過去の発生症例の写真や情報等も併せて整理し、マニュアルに活用した。

検査所で常備している試薬等を利用し、より迅速な診断ができるよう、微生物学的検査、病理学的検査について検査手技を実地に確認しながらマニュアル化した。また、過去にヨーネ病と診断された症例の保存菌株を、ヨーネ菌用培地（共立）を用いて、再培養し、各検査で必要となる陽性コントロール等を作製、各検査所へ配布した。

結果

(1) アンケート調査の結果(107名回答/112名)、ヨーネ病の検査経験がない検査員は84%(90名/107名)、また、保留にした場合の採材部位がわからない、自信なしと回答した検査員は80%(86名/107名)、保留後の検査手順が分からない、自信なしと答えた検査員は91%(97名/107名)にのぼった(図1)。この結果から、そのほとんどが検査手技や消毒等の対応

に不安を感じていることが明らかとなった。

(2) マニュアルの構成は、①生体・解体所見、②採材部位、③抗酸菌染色、④迅速組織標本作製、⑤PCR、⑥細菌培養、⑦判定、⑧分別・消毒の8つの項目を柱とし、それぞれの手順や検査手技等を詳しく解説するスタイルとした。目次については、生体検査、家畜保健衛生所への届出に至るまでの検体採取、枝肉等の処置及び消毒等の一連の流れをフローチャート化し、各時点で必要となる手順の確認が容易にできるよう工夫した。



図1 アンケート調査結果

①生体・解体所見：ヨーネ病を疑う症状や所見に

については、過去の症例写真等を活用し、注意すべき点を具体的に説明した。

②採材部位： 保留時の採材部位については、家畜保健衛生所における病性鑑定も考慮し、ヨーネ病検査マニュアル（動衛研2016.4.1版）で指定する回腸末端部の4カ所をはじめとして、表や写真等を利用して分かりやすく記載した。

③抗酸菌染色： 擦過組織標本と組織標本について、TB stain kit Kを用いた抗酸菌染色法を掲載した（図2、図3）。

擦過組織標本とは、回腸粘膜組織をマイクロトームの刃等で掻き取り、2枚のスライドグラスで圧挫した標本で、通常のスタンプ標本と比べ抗酸菌の検出率が上がることが期待され、加えて、バラバラの細胞だけでなく、ある程度組織形態を保持した上皮組織の観察も可能となるため、ディフクイック染色等により絨毛内の類上皮細胞の有無も確認できるメリットもある。

④迅速組織標本作製： 病変部回腸を1cm×2cm程度に分割し、深型シャーレ等に入れた20%中性緩衝ホルマリンに浸漬しながら細切（2枚のマイクロトームの刃を交差させる）し、最終的には1mm以下に切り出して検体とし、これを45℃で1時間半～2時間程度固定後、包埋までを約4時間で行う迅速組織標本作製法を掲載した。この方法を用いることにより、保留の翌日には、HE染色や抗酸菌染色の組織標本の観察が可能となる。組織に若干の収縮がみられるが、最低限の組織観察は可能であり、ヨーネ病の特徴病変（肉芽腫病変）は十分観察できる。

また、組織を観察する際に、ヨーネ病の特徴病変や菌形態等を理解しやすいよう、典型症例の組織写真やイラストも掲載した（図4）。



図2 抗酸菌染色方法

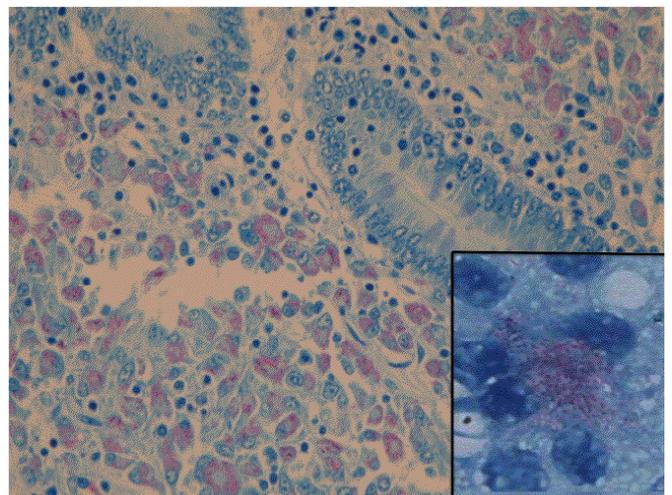


図3 抗酸菌染色結果（組織及びスタンプ標本）

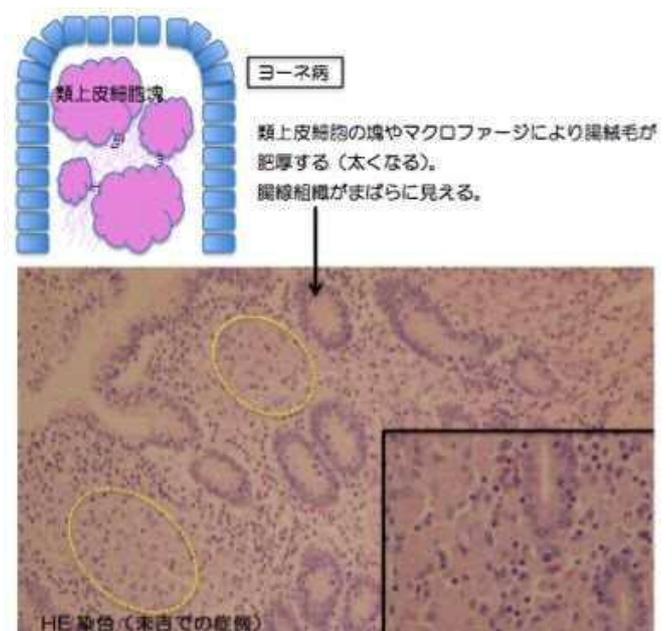


図4 ヨーネ病特徴病変の説明

⑤PCR： IS900をターゲット遺伝子に、InstaGeneを用いて生材料からDNAを抽出して行うPCR法を採用し、PCR mastermixあるいはTakaraのキットを用いて3時間程度で結果が出るプロトコール（図5）と実際の泳動像（図6）を掲載した。

生材料を用いたPCR

【DNAの抽出】(InstaGeneを使用)
 検体（脂肪膜、腸リン/節）100mgを1.4mlビーズチューブに採取し、マルチビーズシャッカーで4000rpm、1min、50℃で振盪し、凍結を解かす。凍結を解かすことで10倍程度の抽出率向上が期待される。

【DNA抽出】 InstaGene

【プライマー】
 MP10-1-5' ATGCGCCACGACTTGCAGCCT 3'
 MP11-1-5' GGCAGGGCTCTTGTGTAGTG 3'

【反応液調製】 常備試薬の2種類

【所要時間】 3時間程度

1 PCR 反応条件 (Total 50μl)

PCR Master Mix (エメラルドグリーン)		TAKARA キット	
PCR Master Mix	25	10×Buffer	5
Primer 10-1(10pmol/μl)	2.5	dNTP	4
Primer 11-1(10pmol/μl)	2.5	Primer 10-1(10pmol/μl)	2.5
DW	15	Primer 11-1(10pmol/μl)	2.5
動物検体 DNA液	5	TakaraExTaq	0.25
		DW	30.75
		動物検体 DNA液	5

2 PCR 温度条件

95℃ 15min
 ↓
 95℃ 30sec
 ↓↑ 35 cycles
 ↓
 68℃ 1min
 ↓
 4℃ ∞

図5 PCRの手順

PCR泳動像

183bp

1 2 P1 P2 N 1 2 P1 P2 N

PCR Master Mix TAKARA kit

1: 回帰(陽性牛)
 2: 回帰(正常牛)
 P1: 動物衛生研究所 陽性コントロール
 P2: 大口検査所作製 陽性コントロール
 N: 陰性コントロール

図6 PCRの結果

⑥細菌培養： ヨーネ菌の培養には時間を要するため、実質的な判定材料にはならないが、確認のための検査として、ヨーネ菌用培地と3%小川培地（マイコバクチン依存性を確認するための対照培地）を用いた培養方法と培地での発育状態の写真を、腸粘膜やリンパ節、腸内容物の前処理方法と併せて記載した（図7）。

⑦判定： 判定は、マニュアルに掲載したPCR検査、病理学的検査結果の組合わせに基づき、様々なケースを想定し、一覧表として掲載した（図8）。「牛ヨーネ病」と判定するのは、PCR検査で陽性、組織標本抗酸菌染色で抗酸菌が確認でき、かつ肉芽腫性病変が認められる場合であり、判定後は命令書を発行し、管轄家畜保健衛生所に届け出ることとした。それ以外の結果の場合は、手技的ミスも考慮して再検査を実施するとともに、家畜保健衛生所や他の検査所等と連携して判定することとした。



図7 ヨーネ菌用培地での発育

PCR	抗酸菌（組織標本）	肉芽腫病変（組織標本）	判定診断
+	+	+	1
+	+	-	2
+	-	+	3
-	+	+	4
-	+	-	5
-	-	+	6

- 1 検査所での「判定診断」※疾病名は「牛ヨーネ病」
- 2 判定保留
- 3 判定保留
- 4 非定型抗酸菌等による肉芽腫性病変が疑われるため（まれに報告がある）、再度PCRを実施。陰性を確認した後、合格とする。
- 5 非定型抗酸菌等による肉芽腫性病変を伴わない腸炎の可能性も否定できないため、再度PCRを実施し、陰性を確認した後、合格とする。
- 6 抗酸菌以外を原因とする肉芽腫性病変が疑われるため、再度PCR、抗酸菌染色を実施。陰性を確認した後、合格とする。

図8 判定一覧表

⑧分別・消毒： 現場で実施可能な方法を、必要に応じて使い分けることができるよう、洗浄剤等による物理的な洗浄の徹底を基本に、83℃の温湯や500～5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムによる器具等の消毒、消石灰による施設周囲等の消毒方法について記

載した。

分別や洗浄消毒のタイミングとしては、解体検査でヨーネ病を疑って保留した時点で、まずは施設側に分別管理の指示を行い、物理的な洗浄を徹底させ、次に、塗抹標本の抗酸菌染色で抗酸菌が確認された時点で管轄の家畜保健衛生所に情報提供し、指示を仰ぐとともに、施設側に本格的な消毒作業を開始させることとした。

考察

アンケート調査結果をもとに、検査員が特に不安に感じている点について詳しく解説を行ったことで、ヨーネ病の症例を経験したことがない検査員にとっても分かりやすいマニュアルとなった。また、目次を、発生からの時系列で整理したフローチャート形式としたことで、発生から届出までの全体的な推移を意識しながら、各時点で必要とされる検査や対処方法が参照しやすい構成となった。

検査方法は、出来るだけ短時間で診断が行えるものを取り入れたため、本マニュアルを参考に対応すれば、実際にヨーネ病が疑われる症例に遭遇した際にも、適切かつ迅速に対処できるのではないかとと思われる。記載した検査方法については、実地に確認、試行錯誤しながらマニュアル作成作業を行ったため、図らずも各検査員がこれらの検査技術を習得する結果となった。本マニュアルと今回作製した陽性コントロールを各所で活用することで、発生を想定した試験を実施できるため、検査技術の習得が期待されるとともに発生時の備えになると考える。

なお、今回のマニュアルは、あくまでもたたき台として作成したものであるため、各所及び処理場の実情に応じて加筆、修正等を加えて、使い勝手のいいものにしていただきたいと考えている。今後、他の疾病マニュアルを作成する際には、今回のマニュアル構成も参考にいただければ幸いである。

参考文献等

マニュアル作成にあたり、検査や消毒方法、ヨーネ病の類焼鑑別等の参考とした文献等を以下に示す。

- 1) 樋之口香, ほか: と畜場における牛のヨーネ病診断事例, 平成12年度鹿児島県食肉衛生検査所事業概要, 113-115 (2000)
- 2) 田澤陸, ほか: と畜場で発生したヨーネ病の検査事例, 平成26年度鹿児島県食肉衛生検査所事業概要, 79-81 (2014)
- 3) NIAH: ヨーネ病検査マニュアル(2016.4.1版)
- 4) 藤野晃司: 牛の接合菌による好酸球性肉芽腫性十二指腸炎, 日獣会誌 64, 715 (2011)
- 5) 塚原敬典, ほか: 褐毛和種子牛のMycobacterium avium Complex 血清型8感染例, 日獣会誌 49, 13-16 (1996)
- 6) 稲葉七巳: 牛の非定型抗酸菌症の発生と抗酸菌の鑑別方法, 平成28年度愛知県畜産技術業績発表会集録
- 7) (社)日本緬羊協会: めん羊・山羊の特定疾病手引書(1998)
- 8) 辻明良: 医療現場における次亜塩素酸ナトリウムの特性と有用性, Kao Hygiene Solution No.7, 15-17 (2004)
- 9) 日本結核病学会, ほか: 結核菌検査に関するバイオセーフティマニュアル (2005年第2版)
- 10) 日本感染症学会: 施設内相談窓口 Q6(2008)
- 11) 西内由紀子, ほか: 抗酸菌およびそのバイオフィルムに対する次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素ガス溶存液の殺菌効果, 環境感染誌 vol. 30 No.4, 243-248 (2015)日本結核病学会
- 12) 小室邦子, ほか: 膀胱癌診断における圧挫細胞診の有用性について, J.Jpn.Soc.Clin.Cytol. 33(6), 1026-1032 (1994)

食鳥検査結果と農場生産成績との関連性

平良和代，神田裕一，鹿島正文
末吉食肉衛生検査所

はじめに

食鳥検査制度が平成4年に始まり，検査結果は適宜生産者側にフィードバックされている。しかしながら，食肉衛生検査所においては農場サイドの情報を得る機会が少ないことから，検査結果と生産成績（以下，成績）を比較する機会が少ない。今回生産者側の協力により成績の情報を入手できたため，食鳥検査結果との関連について調査した。項目としては比較的肉眼所見が明らかで発生頻度の高い肝炎及び腹水症を対象に実施した。また，肝炎で一部廃棄となった肝臓については種々の細菌が分離されたとの報告[1]があり，鶏群の健康状態を知る手がかりとして肝炎を対象に微生物学的及び病理学的検査を実施したので，併せて報告する。

材料と方法

平成29年5月に管内処理場に出荷された農場をランダムに抽出した7農場約19万羽を対象に，食鳥検査結果と成績について比較した。成績の評価方法は一般的に用いられる生産指数[2]に坪重量を加えたものを使用した（図1）。

食鳥検査成績と生産成績
 調査対象：平成29年5月 管内食鳥処理場の7農場
 食鳥検査成績：食鳥検査システム
 生産成績：生産指数(PS) + 坪重量

$$\text{生産指数 (PS)} = \frac{\text{生存率 (\%)} \times \text{出荷個体重 (kg)}}{\text{出荷日齢} \times \text{飼料要求率 (FCR)}} \times 100$$

$$\text{坪重量} = \frac{\text{出荷羽数} \times \text{出荷体重 (kg)}}{\text{鶏舎坪数}}$$

$$\text{飼料要求率 (FCR)} = \frac{\text{飼料給与量 (kg)}}{\text{出荷羽数} \times \text{出荷体重 (kg)}}$$

図1 生産指数，坪重量，飼料要求率計算式

肝炎（図2）に関しては，同疾病と判定した肝臓26検体及び正常のもの25検体を採取し重量測定後，微生物及び病理学的検査を実施した。

微生物学的検査においては，食鳥肉衛生及び生産性に影響を与えると思われる菌種について，肝臓1gをPBSで10倍希釈し，サルモネラ属菌・カンピロバクター属菌は1mlを増菌培養後選択培地で，大腸菌・クロストリジウム属菌・黄色ブドウ球菌に関

しては希釈液0.1mlを直接選択培地に塗抹した（表1）。



図2 肝炎及び腹水症例

表1 使用した増菌培地及び選択培地

肝臓の重量測定
微生物学的検査
肝臓の1gをPBSで10倍希釈し，希釈液1mlを増菌培養後選択培地に，または0.1mlを選択培地に塗抹

	増菌培地	選択培地
サルモネラ属菌	RVS	MLCB BGS
カンピロバクター属菌	プレストン	CCDA
大腸菌	—	DHL
クロストリジウム属菌	—	卵黄加CF
黄色ブドウ球菌	—	卵黄加マンニット食塩

病理学的検査は 10 %中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を施し組織学的検討を行った。

結果

C・D 農場はセミウインドレス鶏舎，G 農場はウインドレス鶏舎で他は開放鶏舎で，成績は 488.9 ～ 558.3 で平均は 518.5 であった。腹水症の発生率は 0.229 ～ 0.809 %で平均は 0.526 %，肝炎の発生率は 0.106 ～ 0.627 %で平均は 0.273 %だった。また全部廃棄率は 0.624 ～ 2.485 %で平均は 1.622 %だった（表 2）

表 2 成績と食鳥検査結果

農場	PS+ 坪重量 (Kg)	腹水症 発生率 (%)	肝炎発生率 (%)	全部廃棄率 (%)
A	488.9	0.809	0.627	2.485
B	490.4	0.330	0.106	0.933
C	505.6	0.565	0.212	1.220
D	523.5	0.652	0.266	1.798
E	526.1	0.229	0.157	0.624
F	537.0	0.496	0.280	1.037
G	558.3	0.675	0.203	1.115
全体平均	518.5	0.526	0.273	1.622

A・B・E・F：開放鶏舎，C・D：セミウインドレス鶏舎，G：ウインドレス鶏舎

全部廃棄については，腹水症が最も多く，約 4 割を占めていた。腹水症で廃棄する場合，と体が大きい傾向があったので，腹水症と出荷個体重についての関係を調査したところ，相関係数は 0.75 と強い相関がみられた。

全部廃棄率との相関については，腹水症の全部廃棄率と肝炎による一部廃棄率についてはそれぞれ 0.75，0.89 と強い相関がみられた。

生産成績との相関については腹水症の相関係数は 0.04 で相関はなかったが，肝炎の廃棄率，全部廃棄率との相関については，-0.33，-0.41 で負の弱い相関がみられた。

重量に関しては肝炎の平均重量は 78.47 g で正常の平均重量は，58.64g で約 20g のが見られ，t 検定により有意差が認められた。成績の低い農場からは

大腸菌，カンピロバクター属菌およびサルモネラ属菌が検出され，一方，成績の良好な農場では大腸菌のみが検出される傾向があった。（表 3）C 農場で分離されたサルモネラ属菌は，08 群だった。カンピロバクター属菌は C・D 農場では *C.coli*，A・E 農場では *C.jejuni* が分離された。また，いずれの検体からも黄色ブドウ球菌クロストリジウム属菌は分離されなかった。

農場	肝炎廃棄率	サルモネラ属	カンピロバクター属	大腸菌
A	0.627	0/5	5/5	3/5
B	0.106	0/4	0/4	0/4
C	0.212	3/5	2/5	5/5
D	0.266	0/1	1/1	0/1
E	0.157	0/1	1/1	1/1
F	0.280	0/5	0/5	2/5
G	0.203	0/5	0/5	1/5
全体平均	0.273	3/26	9/26	12/26

サルモネラ属菌検出：C農場（08群）
カンピロバクター属菌検出：C・D農場（*C.coli*），A・E農場（*C.jejuni*）
黄色ブドウ球菌・クロストリジウム属菌は全農場で検出せず

表 3 肝炎の廃棄率と細菌分離率

病理学的には，肝炎と判断した肝臓では化膿性肉芽腫性炎，偽好酸球やリンパ球の炎症細胞浸潤がみられた。

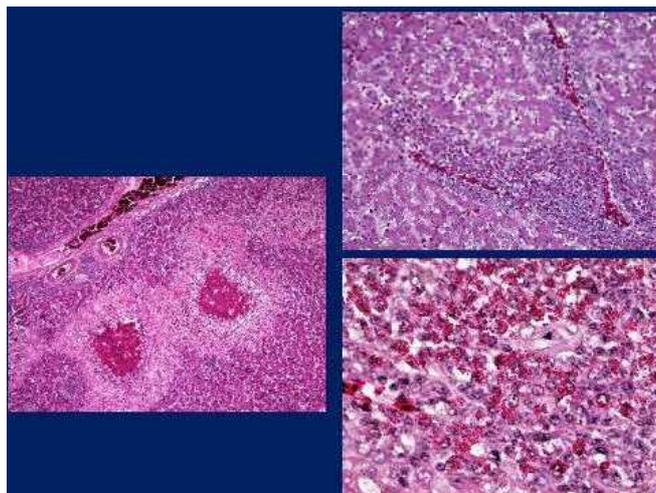


図 3 病理学的所見

考察

今回調査した農場は，発育のよい個体での腹水症による廃棄率が高かったことから，同症を減らすこ

とは成績改善につながると思われる。また、肝炎と判定した肝臓から大腸菌が最も多く分離されたことから、呼吸器感染症の大腸菌症との関連性を究明することで、同症による廃棄率も低減でき、食鳥処理場における交差汚染軽減化による食鳥肉の衛生向上につながることも示唆される。また、肝炎及び腹水症ともに成績との関連性を明らかにできなかったが、農場の生産性向上にはフィードバックは重要であり、今まで以上に家畜保健衛生所等との連携を強化する必要があると考えられた。

参考文献

- [1] POULTRY DISEASES AND MEAT HYGIENE
A COLOR ATLAS Drago C. Herenda, DVM
Don A Franco, DVM, MPH IOWA STATE
UNIVERSITY PRESS /AMES 67～87, 1996
- [2] チャンキーブロイラー 管理マニュアル
日本チャンキー協会 108, 2009

2 過去の業績発表及び調査研究（平成10年度以降）

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
平成10	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 豚赤痢様病変及び大腸炎を呈した豚の結腸粘膜から分離された <i>Serpulina</i> 属菌の性状について と畜場で認めれた牛の悪性水腫について 豚肺炎からの <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> の分離 豚の敗血症（第1報） PCRにおけるペロ毒素産生性大腸菌検出感度の向上 豚におけると畜検査データの解析とフィードバックシステムへの応用 養豚農家へのフィードバック事業
平成11	知覧食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 精度管理の立場からみた <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus mycooides</i>, <i>Micrococcus luteus</i> の各種抗生物質の感受性について 牛の病畜検査状況と健康畜で検査した枝肉及び肝臓の疾病状況（誌上発表） 豚の敗血症（第2報）ーフィードバック事業の1つの成果ー 牛の肝臓及び胆汁からの <i>Campylobacter</i> 属菌の検出 豚盲腸内容物におけるサルモネラ保菌調査 と畜場で認められた牛の嚢胞腺癌の1症例 豚血清中のインフルエンザウイルス抗体の継続的観察
平成12	知覧食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 鶏白血病について 肝蛭による病変 筋間水腫における一考察 と畜場における牛のヨーネ病診断事例 豚の敗血症（第3報）ーフィードバック事業の一例ー と畜場で認められた牛の顆粒膜細胞腫の1症例 HPLCによる合成抗菌剤及び寄生虫用剤の同時分析法の検討 末吉食肉衛生検査所における口蹄疫発生時の対応経過 フィードバック農家の意向調査 ブロイラー養鶏農場におけるサルモネラ衛生対策～その1～
平成13	阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 気腫疽と悪性水腫の鑑別と迅速診断 県下の大規模食鳥処理場における細菌汚染調査について 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）の抗体保有率及び分離状況について 豚頭肉の汚染状況 と畜場搬入牛・豚におけるQ熱リケッチア抗体保有ならびに <i>Coxiella burnetii</i> 遺伝子の検出状況 ブロイラーにおけるサルモネラおよびカンピロバクター保菌調査

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
平成14	知覧食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・敗血症(心内膜炎型)の培養法に関する検討 ・豚のリンパ類上皮細胞性(Lennert)リンパ腫の一例 ・DFD様筋肉変性鶏(ブロイラー)に対する伝染性気管支炎ウイルス(IBV)および腎疾患の関与について ・湯はぎ式解体ラインにおける枝肉細菌数の推移 ・と畜段階及び生産段階における発育不良豚の実態と処理方法に関する一考察
平成15	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・関節炎型豚丹毒の凝集反応法による診断法の検討 ・発育不良の黒毛和種牛における腎尿細管異形成の一症例 ・正常肥育豚の血液検査及び発育不良豚との比較 ・慢性貧血が疑われた高齢牛の一症例 ・豚丹毒迅速診断の比較検討 ・と畜豚の肺疾患及び豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルス(PRRSV), 豚サーコウイルス2型(PVC2)および豚オーエスキー病ウイルス(ADV)との関係について ・ブロイラーにおける胆管肝炎の病理 ・湯はぎ式解体ラインにおける衛生管理への取り組み
平成16	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・黒毛和種牛におけるクローディン16欠損症とその類似疾患 ・豚カット室における細菌数の変動と衛生対策の効果 ・豚のアレルギー性皮膚炎について ・食鳥検査でみられたブロイラーの<i>Aspergillus flavus</i>感染症 ・牛, 豚の体表におけるリステリア属菌付着状況調査 ・と畜場で発見される豚抗酸菌症への一考察(ホルマリン固定材料からの抗酸菌検索) ・豚解体処理工程別の枝肉細菌数の推移と衛生管理の改善への試み ・PCRによる<i>Clostridium chauvoei</i>と<i>Clostridium septicum</i>の迅速鑑別診断の検討 ・DFD様筋肉変性鶏の過酸化脂質及び深胸筋と肝臓のプロテオーム解析 ・管内一と畜場におけるサルモネラ浸潤状況
平成17	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・発育不良豚血漿のプロテオーム解析 ・成鶏に見られた骨外性骨肉腫の一例 ・と畜検査時にみられた牛のアクチノバチルス症 ・<i>Clostridium septicum</i>分離同定法の一考察 ・クマリン系殺鼠剤中毒を疑った豚のHPLC分析 ・豚丹毒迅速診断の比較検討(第2報) ・牛の胆汁中における<i>Campylobacter</i>汚染調査及び分離菌株の遺伝子型比較 ・大規模食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染状況調査 ・豚赤痢のPCR法導入による迅速診断と病理組織学的診断の比較検討 ・PCR法による抗酸菌検出法の検討 ・間質性肝炎を呈する豚肝臓の細菌汚染調査(第1報) ・寄生虫用剤イベルメクチンの牛への残留状況について ・残留抗生物質簡易検査における<i>Bacillus mycoides</i>芽胞原液作成法の検討

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
平成18	阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・異常な臭い及び黒色を呈する牛の大腸に関する調査 ・ <i>Streptococcus gallolyticus</i>が分離されたブロイラーの心内膜炎 ・ 食鳥検査データからみたと体廃棄の原因疾病 ・ 牛枝肉の脳・脊髄組織汚染状況調査及び汚染除去方針の検討 ・ 豚敗血症（心内膜炎型）からの <i>Streptococcus suis</i>分離状況調査 ・ ブロイラーの育成から出荷過程におけるカンピロバクター汚染状況調査 ・ 牛血漿のSDS-PAGE解析 ・ 食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染状況調査（第1報） ・ 緊急搬入牛から検出されたイベルメクチンについて（症例報告） ・ 豚腸管由来の多剤耐性 <i>Salmonella Typhimurium</i>(ST)分離状況と分離株の特徴
平成19	串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・ と畜場搬入豚由来 <i>Salmonella Choleraesuis</i>の薬剤感受性とプラスミドプロファイル ・ バイオアッセイによる抗菌性物質の感受性試験 ・ 牛の好酸球性筋炎の1症例 ・ 管内と畜場でみられた豚サルモネラ症の発生状況 ・ 食肉衛生検査所における牛の腫瘍 ・ 県下で分離された腸管出血性大腸菌0157の疫学的検討 ・ 牛，豚糞便からの0157分離状況調査 ・ 残留抗生物質簡易検査用 <i>Bacillus mycoides</i>芽胞菌液作成及び保存法の検討 ・ 一部廃棄としたブロイラーの肝炎に関する調査
平成20	知覧食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 病畜牛における血漿中ビタミンA，Eと副腎皮質ホルモン（コルチゾール）の測定 ・ ML培地における豚肝臓の抗菌作用 ・ 県内のと畜場でみられた牛白血病の基礎的調査 ・ と畜場に搬入された豚におけるサルモネラの保菌状況及び疫学的検討（第1報） ・ 豚尿毒症の調査結果について ・ と畜場でみられた牛の腫瘍と牛白血病抗体保有状況 ・ 食肉衛生検査微生物分野におけるカラーアトラスの作成（平成19年度微生物部会調査研究） ・ 家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性成績
平成21	阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 食肉衛生検査所における牛白血病の鑑別 ・ と畜場に搬入される牛のレプトスピラ浸潤状況調査 ・ と畜場搬入豚の肝臓及び盲腸便から分離された <i>Salmonella Choleraesuis</i>の疫学的検討 ・ MGIT法及びPCR法を併用した抗酸菌検出法の検討（平成20年度微生物部会調査研究） ・ 管内と畜場における牛腫瘍の発生状況 ・ サルモネラ相誘導試験における簡易法の検討

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
平成22	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 管内と畜場で見られた緊急搬入牛における肺炎調査 食肉衛生検査所の施設検証の取り組みについて 食肉衛生検査所のフィードバックの取り組みについて 黒毛和種にみられた転移を伴う腎臓腫瘍 大規模食鳥処理場における衛生実態調査 住肉胞子虫の寄生が認められた牛の好酸球形筋炎の一症例 豚疣状心内膜炎由来β溶血性<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>の薬剤感受性と遺伝学的特徴 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>による豚の疣状性心内膜炎の発生実態 豚の疣状性心内膜炎から分離された<i>Actinobacillus equuli subsp. equuli</i>
平成23	阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 食肉・食鳥検査等カラーアトラスデータの簡易データベース化 対米輸出食肉を取り扱うと畜場等に係る認定までの衛生指導について 食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染低減への取り組み 管内と畜場で分離された<i>Salmonella Choleraesuis</i>の性状 管内と畜場における豚丹毒の疫学的検討 管内と畜場で牛白血病が疑われた症例の検討 牛のリンパ腫におけるスタンプ標本を用いた免疫組織化学的検査の有用性 全身性腫瘍が疑われた牛2例の病理組織学的検討 食鳥処理場におけるESBL産生<i>Escherichia Coli</i>の浸潤調査
平成24	知覧食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> 管内と畜場でみられた敗血症型豚丹毒2症例 牛胆汁及び直腸便の<i>Campylobacter jejuni/coli</i>分離状況及び分離方法の検討 大規模食鳥処理場における施設衛生指導について 管内と畜場における豚丹毒の発生状況 豚丹毒が多発した農場の分離株における遺伝子型別と薬剤感受性 MALDI-TOF MS活用による豚丹毒菌迅速同定法の検討（第一報） LAMP法を用いた<i>Streptococcus. suis</i>の検出法の検討 T細胞性リンパ腫の病理組織学的検討 リンパ腫と中皮腫の併発が疑われた牛の病理組織学的検討 と畜場搬入豚由来<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>の薬剤感受性 PCR-RFLP法により未知の遺伝子型が確認された牛白血病の一症例

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
平成25	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・成鶏における <i>Campylobacter jejuni/coli</i> の保菌調査及び検出法の検討 ・病畜と室における牛のと畜検査概要 ・と畜検査における腸病変(牛・豚)の病理アトラス作成 ・ブロイラーのカンピロバクター保菌調査及び食鳥処理場の汚染状況(第1報) ・対米等牛肉輸出認定施設におけると畜解体工程の衛生管理に係る検証 ・と畜場で認められた牛の悪性水腫の検査と対応(事例報告) ・Propidium monoazide(PMA)を用いた豚丹毒早期診断法の検討 ・ブロイラーにおけるカンピロバクターの保菌及び製品汚染調査 ・<i>Streptococcus. suis</i> におけるST1complexの分布状況調査及び簡易識別法の検討 ・対シンガポール輸出食肉を取り扱うと畜場等の認定までの経緯と対応
平成26	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・牛の真性多血症の一例について ・牛の肝臓・胆嚢及び糞便における腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの保菌状況調査 ・カンピロバクター保菌調査及び食鳥処理場における汚染状況調査 ・と畜検査でみられた牛の脳幹部硬膜下膿瘍 ・大規模食鳥処理場の各処理工程におけるカンピロバクター汚染実態調査 ・ワーキンググループを活用したと畜場等への衛生講習会 ・食鳥検査でみられた鶏マラリア ・県内と畜場における豚丹毒の発生状況 ・と畜場で発生したヨーネ病の検査事例 ・腸内細菌科群数を用いた牛豚枝肉の胃腸内容物汚染の検討 ・対米等及び対EU輸出牛肉認定施設におけるサルモネラ属菌の分離試験に関する一考察 ・プレミックス試薬を用いたダイレクトコロニーPCR法の検討
平成27	知覧食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・マルボフロキサシン残留が認められた牛の一例 ・牛のマイコプラズマ関連疾病肝臓 ・と畜検査でみられた皮膚型牛白血病および非定型型牛白血病 ・ブロイラーの多発性黒色腫 ・豚にみられた腎芽腫の1例 ・豚と畜検査データフィードバックにおけるSEPグレード分けの取り組み ・<i>Clostridium</i>属菌が分離された4症例と検査方法の検討 ・食鳥におけるサルモネラの保菌状況調査 ・枝肉検査時に認められる牛胸部石灰化病変の検討 ・豚と畜場及び食肉処理場における衛生指導の一考察

平成27	鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・と畜検査において、豚骨髄性白血病を疑った事例 ・保存菌株台帳のデータベース化とその活用の検討
平成28	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・と畜場における牛枝肉の衛生対策 ・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 ・<i>Mycoplasma bovis</i> が関与した牛の心内膜炎 ・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 ・鹿児島県内の大規模食鳥処理場で分離された <i>Salmonella Infantis</i>, <i>S.Schwarzengrund</i> 及び <i>S. Manhattan</i> の保有プラスミドと薬剤耐性 ・BLV陰性牛でみられたB細胞性リンパ腫 ・FSIS（米国食品安全検査局）指摘事項の変遷 ・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） ・牛にみられた腹腔内播種性腫瘍の1例 ・食鳥処理場で分離された大腸菌の薬剤感受性
平成29	知覧食肉衛生検査所 串木野食肉衛生検査所 阿久根食肉衛生検査所 大口食肉衛生検査所 末吉食肉衛生検査所 志布志食肉衛生検査所 鹿屋食肉衛生検査所	<ul style="list-style-type: none"> ・生食用食鳥肉加工工程における細菌汚染実態調査 ・大規模食鳥処理場におけるカンピロバクター等の微生物汚染の調査とその対策～厚生労働省「亜塩素酸水処理による微生物低減策の有効性実証事業」～ ・豚赤痢の分離培地及び検査法の検討 ・黒毛和種における <i>Mycoplasma bovis</i> の浸潤状況 ・ヨーネ病対応マニュアルの作成 ・スタンプ標本を用いた免疫組織化学的染色による牛白血病の簡易診断法 ・尿毒症に係る検査方法の調査 ・食鳥検査結果と農場生産成績の関連性 ・牛及び豚敗血症由来 <i>Trueperella pyogenes</i> の薬剤感受性と遺伝学的特徴 ・鶏大腸菌症由来 <i>Escherichia coli</i> の薬剤耐性および遺伝学的特徴 ・<i>Clostridium</i> 属菌の混合感染症における菌種同定PCR法の検討 ・牛の原発不明腺癌の1例