

第3章 調査研究

令和4年度 調査研究

- 1 精密検査における *Streptococcus suis* の同定方法の検討
鹿屋食肉衛生検査所 佐藤 史子
- 2 と畜場における豚副生物の細菌汚染実態調査
串木野食肉衛生検査所 杉本 源
- 3 鶏における *Clostridioides difficile* の保菌状況調査
阿久根食肉衛生検査所 戸田 昌宏
- 4 と畜場出荷豚におけるPRDC関連病原微生物の検出と分子系統樹解析
阿久根食肉衛生検査所 平島 宜昌
- 5 牛の呼吸器疾患と枝肉重量
末吉食肉衛生検査所 神田 卓弥
- 6 管内と畜場で確認された気腫疽と悪性水腫の症例
知覧食肉衛生検査所 中尾 悠一郎
- 7 と畜検査でみられた *Mycoplasma suis* による豚へモプラズマ病
大口食肉衛生検査所 日高 遼太郎
- 8 管内食鳥処理場で確認されたマレック病と発生農場へのフィードバック事例
末吉食肉衛生検査所 藤田 朋絵
- 9 腹腔内播種性転移を伴う牛の骨外性骨肉腫の一例
知覧食肉衛生検査所 是枝 七奈
- 10 ヒトの二相型中皮腫に類似するウシの中皮腫の1症例
志布志食肉衛生検査所 丸山 覚詞

精密検査における *Streptococcus suis* の同定方法の検討

佐藤史子 栗脇耕二 藤元英樹¹⁾

鹿屋食肉衛生検査所 1) 志布志食肉衛生検査所

はじめに

Streptococcus suis (以下 *S.suis*) は豚の敗血症心内膜炎型(以下Se(Ev))の原因菌の中で最も多く検出される。*S.suis* はこれまで荚膜抗原により35の血清型(1-34及び1/2型)が報告されていたが、近年、血清型の再評価が行われ、29の血清型に再分類された。*S.suis*から除外された6つの血清型(20,22,26,32,33,34型)は、新たに*S.parasuis*, *S.orisratti*,及び*S.ruminantium*の3菌種に分類された。

精密検査時は、 α 溶血性連鎖球菌を確認後、*S.suis*を疑う場合はrapidID32strep等の簡易同定キットで菌同定を実施しているが、近年同定不能となることが増加傾向であり、約1割が同定不能となっている。今回、過去5年間に豚のSe(Ev)から分離され、同定不能であった α 溶血性連鎖球菌を用いて、PCRによる再同定及び精密検査時の*S.suis*の同定方法について検討したので、その概要を報告する。

材料と方法

2017年4月～2022年3月までに、管内と畜場の豚のSe(Ev)から分離された α 溶血性連鎖球菌のうちrapid ID32 Strep等の簡易同定キットで同定不能となった77菌株を供試菌株として用いた。

(1) 同定不能菌のPCRによる再同定

炭酸ガス培養で羊血液寒天培地に発育させた供試菌株を、再分類前の*S. suis*の同定方法として用いられていたOkuwabuaらの方法による*gdh* 遺伝子 (688bp)の検出[1]をコロニーダイレクト法により行った。

Okuwabuaらの方法による*gdh*遺伝子(688bp)の検出 (2003)

- ・コロニーダイレクト法
- ・プライマー JP4 (5'-GCAGCGTATTCTGTCAAACG-3')
JP5 (5'-CCATGGACAGATAAAGATGG-3')
- ・PCR反応条件

・ サイクル前の熱変性	94℃	5min
・ 熱変性	94℃	1min
・ アニーリング	55℃	5min
・ 伸長反応	72℃	1min
・ 最終伸長反応	72℃	7min

35 c

図1 *gdh* 遺伝子の検出方法

再分類後の*S. suis*を同定するために2014年にIshi

daらによって開発された、DNAの修復/組換えタンパク質遺伝子である*recN* 遺伝子(336bp)の検出[2]をアルカリ熱抽出法で行った。

Ishidaらの方法による*recN*遺伝子(336bp)の検出 (2014)

- ・アルカリ熱抽出法
- ・プライマー SSrecN-F (5'-CTACAAACAGCTCTCTTCT-3')
SSrecN-R (5'-ACAACAGCCAATTCATGGCGTGATT-3')
- ・PCR反応条件

・ サイクル前の熱変性	94℃	2min
・ 熱変性	94℃	30sec
・ アニーリング	60℃	10sec
・ 伸長反応	68℃	30sec
・ 最終伸長反応	68℃	5min

30c

図2 *recN* 遺伝子の検出方法

(2) 精密検査で実施可能な同定方法の検討

精密検査で実施可能な*S. suis*の同定方法の検討として、コロニーダイレクト法による*recN* 遺伝子の検出を行い、従来法であるアルカリ熱抽出法との比較を行った。

結果

コロニーダイレクト法による*gdh* 遺伝子 (688bp)

の検出については、供試菌株77菌株全て *gdh* 遺伝子産物の増幅を認めた。

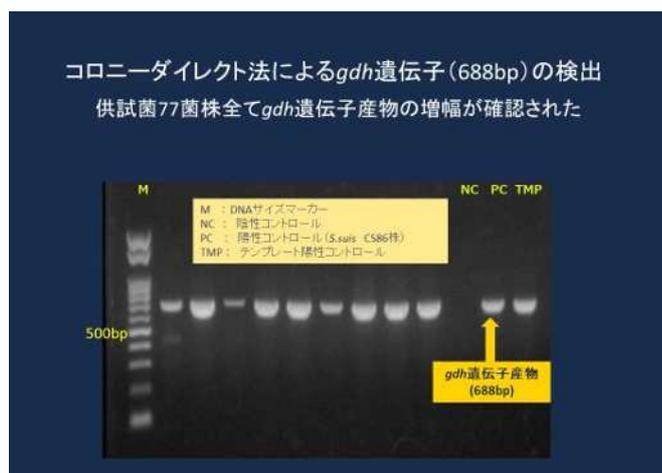


図3 *gdh* 遺伝子 (688bp)の検出結果

アルカリ熱抽出法による *recN* 遺伝子 (336bp) の検出については、74/77菌株 (96.1%) で *recN* 遺伝子産物の増幅を認めた。

コロニーダイレクト法による *recN* 遺伝子の検出は従来法のアルカリ熱抽出法と比較すると、やや感度は低下するが、*recN* 遺伝子産物の増幅を確認することが出来た。また、供試菌株による試験では、アルカリ熱抽出法と同様に74/77菌株で *recN* 遺伝子産物の増幅を認めた。

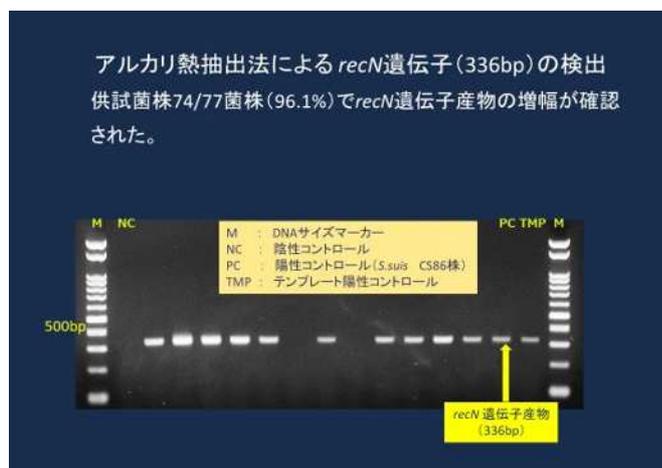


図4 アルカリ熱抽出法による *recN* 遺伝子の検出結果

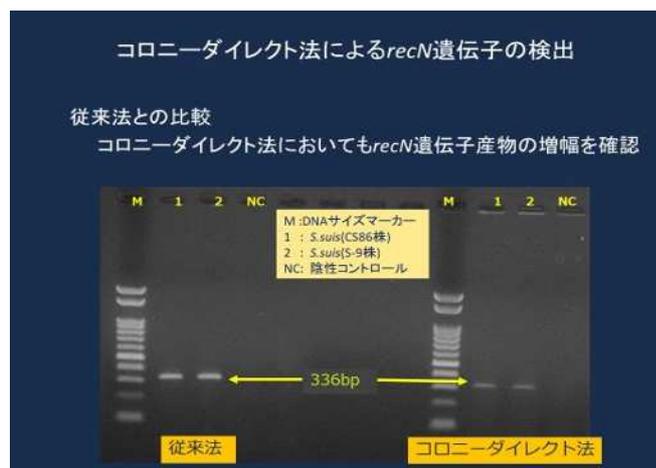


図5 コロニーダイレクト法による *recN* 遺伝子の検出結果

考察

今回の調査において、供試した77菌株全てにおいて *gdh* 遺伝子の検出は、一般的な *S. suis* の同定方法として用いられていたが、既報では、従来の *S. suis* の他、*S. gallinaceus*, *S. ovis*, *S. galloyticus*でも陽性となることがある[3]ことから、*S. suis* の同定には *recN* 遺伝子の検出が有用であると考えられた。

また、*recN* 遺伝子の検出はDNA抽出が不要なコロニーダイレクト法により実施が可能であり、PCR反応時間が約1時間30分と短いことから、再現性の確認後は精密検査への導入が可能であると考えられた。

今回、*gdh* 遺伝子陽性、*recN* 遺伝子陰性の3菌株については、*S. suis* から除外され、新菌種となった *Streptococcus* 属菌、又は前述の *gdh* 陽性となる一部の *Streptococcus* 属菌の可能性があるので、今後も調査を継続する必要がある。

現在までに、不明菌2株についてはTOF-MSを実施しており、1株については *S. gallinaceus* と同定されている。

今回の調査では、野外から *S. suis* 意外の α 溶血性連鎖球菌が分離されたことから、今後はこのような菌に対しても、最新の分類に基づいた同定方法の検討が必要であると考えられた。

参考文献

- [1] Okuwumabua O, Connor M, Shull E: FEMS Microbiol Lett, 218, 79-84 (2003)
- [2] Ishida S, Tien LHT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T: Microbiol Meth, 107, 66-70 (2014)
- [3] Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D: Pathogens 5, e45 (2016)

豚副生物の細菌汚染の実態調査

杉本 源 小牟田綾 山田耕一 外園千代

串木野食肉衛生検査所

はじめに

豚の副生物には、心臓、肝臓、胃、大腸小腸、舌、頭肉、足、子宮等があり、その多くが焼肉やもつ煮込み等の製品として処理され国内の飲食店や一般家庭に広く流通している。しかし副生物の多くは保存性が低く、急激に品質劣化することが知られており、処理工程における細菌数の低減が品質向上のための重要なポイントになっている。また副生物には食中毒菌を保持しやすい製品もあり、交差汚染による食中毒発生のリスクが懸念されている。

今回、管内と畜場における副生物の細菌汚染の実態調査を行ったのでその概要を報告する。

材料及び方法

(1) 副産物製造工程の概要

副生物は、内臓処理室において「消毒前の整形分割」、「消毒冷却」、「梱包」の工程順で製造される(図1)。



図1 副産物製造工程の概要

心臓は整形後、消毒冷却工程の「次亜塩素酸とバブリング」を併せた消毒冷却槽に入れられ、芯温が10℃以下になったところで可食容器に移され、冷蔵保管後に梱包される。

肝臓は整形後、専用の洗浄機を通過させ、「次亜塩素酸とバブリング」を併せた消毒冷却槽で消毒、冷却され、芯温が10℃以下になったところで可食容器に移され冷蔵室で保管、その後金属探知機を通してから、梱包される。

頭肉は整形後、「次亜塩素酸のみの消毒槽」に投入され、その後芯温が10℃以下になったところで

可食容器に移され、金属探知機を通過した後に梱包される。

舌は整形後、金属探知機を通し、「次亜塩素酸の消毒槽」に投入され、その後再度、金属探知機を通した後に梱包される。

(2) 材料及び方法

令和4年5月に、当所管内と畜場で処理された豚の肝臓、心臓、頭肉および舌を、「消毒前」、「梱包直前」の各工程から1回につき各5検体ずつ、計40検体を採材し、合計3日間の3回実施した。検体はビニール袋に入れてPBS100mlを添加後、30回手もみをし、得られた懸濁液を検査に供した。

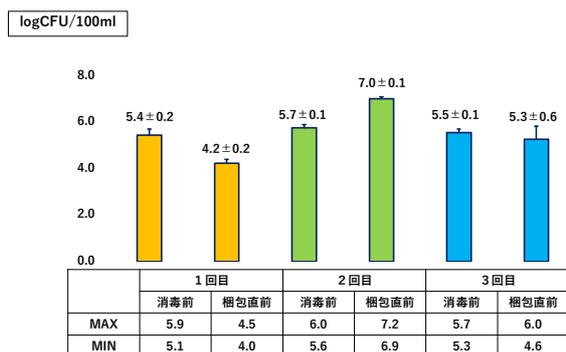
細菌検査は一般生菌数、大腸菌数、サルモネラおよびブドウ球菌を実施した。一般生菌数および大腸菌数は住友3M社製ペトリフィルムAC、ペトリフィルムECを用い、またサルモネラおよび黄色ブドウ球菌は常法にて検査を行った。

結果

菌数は1臓器あたりの測定数を対数表記し、5検体の平均±標準偏差で示した。

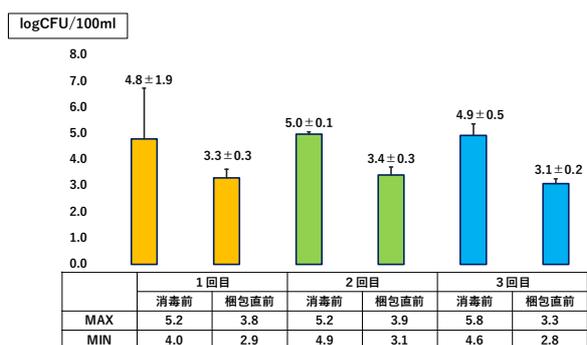
一般生菌数は、肝臓で1回目の検査は「消毒前」 5.4 ± 0.2 、「梱包直前」 4.2 ± 0.2 、2回目は「消毒前」 5.7 ± 0.1 、「梱包直前」 7.0 ± 0.1 、3回目は「消毒前」 5.5 ± 0.1 、「梱包直前」 5.3 ± 0.6 であった(表1)。

表1 肝臓 一般生菌数



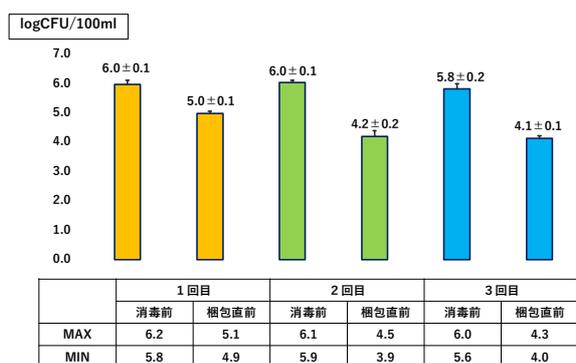
心臓は、1回目では「消毒前」 4.8 ± 1.9 、「梱包直前」 3.3 ± 0.3 、2回目は「消毒前」 5.0 ± 0.1 、「梱包直前」 3.4 ± 0.3 、3回目は「消毒前」 4.9 ± 0.5 、「梱包直前」 3.1 ± 0.2 となった(表2)。

表2 心臓 一般生菌数



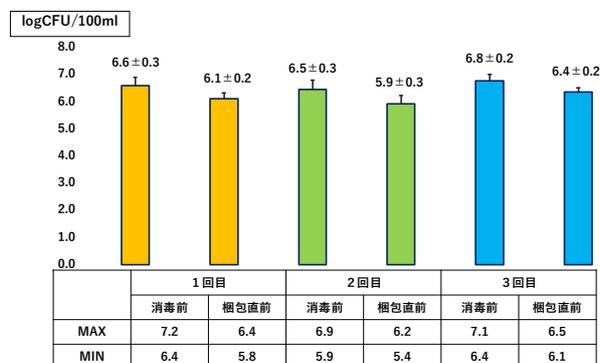
頭肉は、1回目では「消毒前」 6.0 ± 0.1 、「梱包直前」 5.0 ± 0.1 、2回目は「消毒前」 6.0 ± 0.1 、「梱包直前」 4.2 ± 0.2 、3回目が「消毒前」 5.8 ± 0.2 、「梱包直前」 4.1 ± 0.1 となった(表3)。

表3 頭肉 一般生菌数



舌は、1回目では、「消毒前」 6.6 ± 0.3 、「梱包直前」 6.1 ± 0.2 、2回目は「消毒前」 6.5 ± 0.3 、「梱包直前」 5.9 ± 0.3 、3回目は「消毒前」 6.8 ± 0.2 から「梱包直前」で 6.4 ± 0.2 へ減少した(表4)。

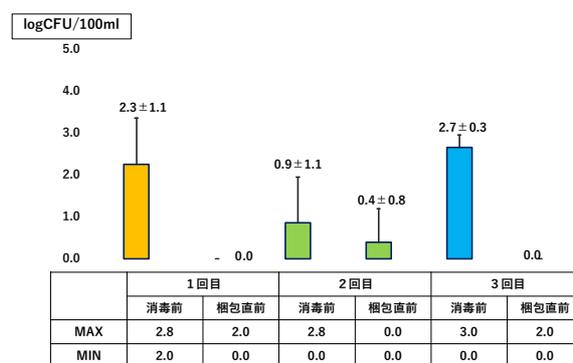
表4 舌 一般生菌数



一般生菌数の動向として、肝臓において「梱包直前」で菌数が微減または増加となる検体を認めた。また、心臓、頭肉、舌では、菌数が減少する結果であったが、舌における減少幅は小さい状況であった。

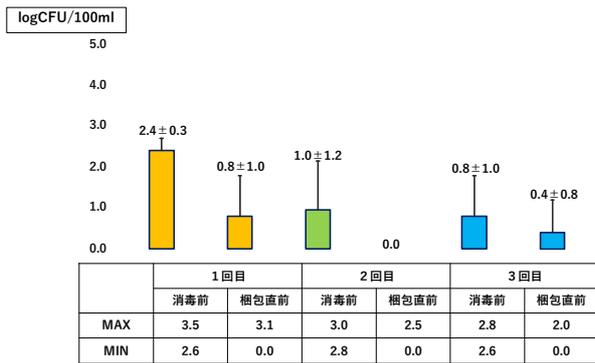
大腸菌数は、肝臓で1回目の検査では、「消毒前」 2.3 ± 1.1 、「梱包直前」は検出なし、2回目は「消毒前」 0.9 ± 1.1 、「梱包直前」 0.4 ± 0.8 、3回目は「消毒前」 2.7 ± 0.3 、「梱包直前」は検出なしとなった(表5)。

表5 肝臓 大腸菌数



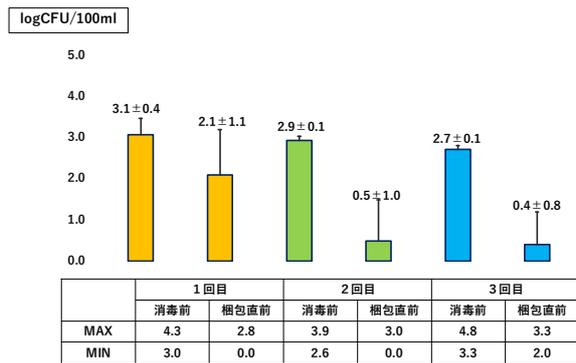
心臓は、1回目では「消毒前」 2.4 ± 0.3 、「梱包直前」 0.8 ± 1.0 、2回目は「消毒前」 1.0 ± 1.2 、「梱包直前」検出なし、3回目は「消毒前」 0.8 ± 1.0 から「梱包直前」で 0.4 ± 0.8 へ減少した(表6)。

表6 心臓 大腸菌数



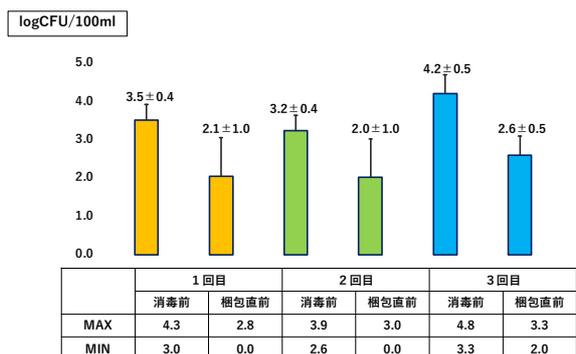
頭肉は、1回目では「消毒前」 3.1 ± 0.4 、「梱包直前」 2.1 ± 1.1 、2回目は「消毒前」 2.9 ± 0.1 、「梱包直前」 0.5 ± 1.0 、3回目は「消毒前」 2.7 ± 0.1 が「梱包直前」で 0.4 ± 0.8 へと減少した（表7）。

表7 頭肉 大腸菌数



舌は、1回目では「消毒前」 3.5 ± 0.4 、「梱包直前」 2.1 ± 1.0 、2回目は「消毒前」 3.2 ± 0.4 、「梱包直前」 2.0 ± 1.0 、3回目は「消毒前」 4.2 ± 0.5 が「梱包直前」で 2.6 ± 0.5 へと減少した（表8）。

表8 舌 大腸菌数



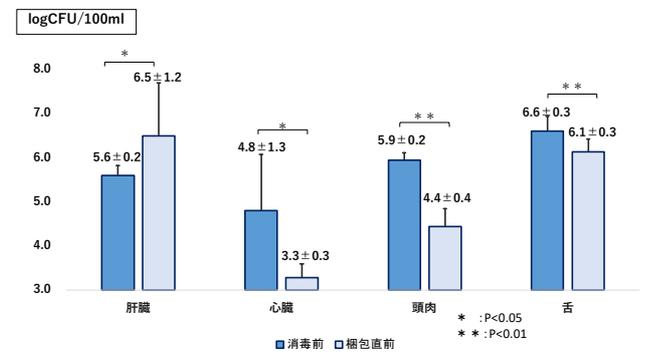
大腸菌数は、「梱包直前」の肝臓および心臓において検出されない検体があったが、頭肉および舌では全ての検体で検出される結果となり、特に舌が高い菌数となった。

各副生物の「消毒前」、「梱包直前」の一般生菌数、大腸菌数について、3回分の合計から平均値を求め、ウェルチのt-検定を行い、結果を比較した。なおp値は0.05未満を統計的に有意とみなした。

一般生菌数について、肝臓では「消毒前」 5.6 ± 0.2 が「梱包直前」 6.5 ± 1.2 へ増加した。心臓は「消毒前」 4.8 ± 1.3 が「梱包直前」 3.3 ± 0.3 へ減少した。頭肉は「消毒前」 5.9 ± 0.2 が「梱包直前」で 4.4 ± 0.4 へと減少した。舌は「消毒前」 6.6 ± 0.3 が「梱包直前」 6.1 ± 0.3 へ減少した。肝臓以外の検体で菌数の減少を認めたが、舌での減少は比較的少なく、小幅なものであった。

t-検定では、肝臓の消毒前、梱包直前間の菌数は $p < 0.05$ で有意に増加し、心臓の菌数は $p < 0.05$ 、頭肉、舌の菌数は $p < 0.01$ で有意に減少していた（表9）。

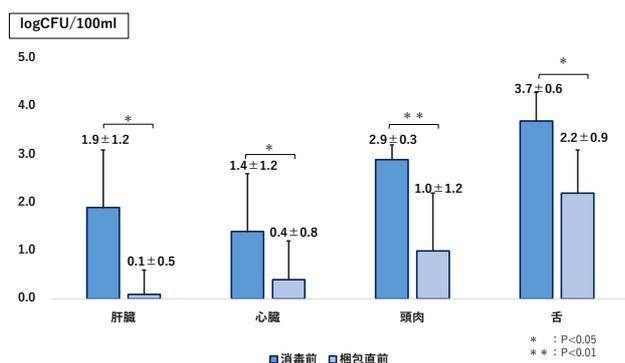
表9 副生物の比較 一般生菌数



大腸菌数について、肝臓では「消毒前」 1.9 ± 1.2 が「梱包直前」で 0.1 ± 0.5 へ減少した。心臓では「消毒前」 1.4 ± 1.2 が「梱包直前」で 0.4 ± 0.8 へ減少した。頭肉では「消毒前」 2.9 ± 0.3 が「梱包直前」 1.0 ± 1.2 へ、舌では 3.7 ± 0.6 から 2.2 ± 0.9 へ減少した。副生物すべてにおいて大腸菌を検出したが、特に頭肉と舌においては高い菌数となった。

t-検定の結果では、肝臓、心臓、舌の菌数は $p < 0.05$ で有意に減少し、頭肉の菌数は $p < 0.01$ で有意に減少していた（表10）。

表 10 副生物の大腸菌数



黄色ブドウ球菌は「消毒前」の舌の8検体、心臓の1検体、「梱包直前」の舌の2検体から検出された(表11)。

表 11 黄色ブドウ球菌検出結果

	消毒前	梱包直前
肝臓	0/15	0/15
心臓	1/15	0/15
頭肉	0/15	0/15
舌	8/15	2/15

サルモネラはいずれの検体からも検出されなかった(表12)。

表 12 サルモネラ検出結果

	消毒前	梱包直前
肝臓	0/15	0/15
心臓	0/15	0/15
頭肉	0/15	0/15
舌	0/15	0/15

まとめ及び考察

肝臓の一般生菌数は「消毒前」より「梱包直前」の数値が高い傾向にあった。「消毒後」から「梱包されるまでの間」の作業で製品が汚染され、数値が高くなった可能性があり、今後、処理工程の点検による問題点の洗い出しを行い、菌数の低減策を講ずる必要があると思われた。

舌の一般生菌数は「消毒前」と「梱包直前」の菌数の差について、t-検定では、有意な菌数の低下を認めたが、他の製品に比べ低下の幅が少ない結果となった。菌数を今より低くするためには現行の消毒方法の見直しを含めた作業の変更が必要と思われた。

大腸菌は各副生物から検出された。特に頭肉と舌の菌数は肝臓と心臓の菌数より高い値となった。頭肉と舌は頭部由来の製品のため口腔内からの汚染の影響を受けやすく、また、製品の構造上、付着した細菌が残りやすいと考えられる。頭肉と舌の大腸菌数を低くするためには現行の消毒方法を見直す必要があると思われた。

黄色ブドウ球菌は舌の「消毒前」及び「梱包直前」の製品から検出された。舌が生体段階から外部に接触しており、黄色ブドウ球菌を保菌しやすい状況にあることがその原因と考えられた。大腸菌と同様に、現状より効果的になるような消毒方法の改善が必要と考えられた。

副生物は、食中毒菌を保持している場合もあることから、流通・販売・調理の各段階において2次汚染に留意した取り扱いが必要と考える。機会を捉えて、関係者への周知を図っていきたい。また、と畜場において、副生物を製造する一連の工程の中で細菌の低減化に繋がるポイントを今後も模索していきたいと考える。

鶏における *Clostridioides difficile* の保菌状況調査

戸田昌宏 三重 益 赤坂敬史郎 宇都誠二

阿久根食肉衛生検査所

はじめに

Clostridioides difficile(以下CD)はヒトにおいて、抗菌薬の服用に起因する抗菌薬関連腸症や偽膜性大腸炎の主要な原因菌である。アメリカでは年間約20000人がCDの感染により死亡していると推計されており、アメリカ疾病管理予防センター(CDC)では最も警戒が必要な細菌感染症(Urgent threat)に指定されている。日本国内においても市販食品から分離されており、近年注目が高まっている。国内では、牛、豚、犬の糞便からの保菌率調査の報告があるが、鶏の保菌率に関しては未調査である。そこで、管内大規模食鳥処理場におけるCDの保菌率の調査を実施した。

材料及び方法

1) 材料

管内大規模食鳥処理場3施設、2021年8月～2022年3月に出荷された鶏300羽から採材した腸内容物を試験に供試した(表1)。

表1 処理場概要

	処理場A	処理場B	処理場C
検体数	160	40	100
品種	ブロイラー	採卵鶏	ブロイラー 地鶏
出荷日齢	47-48	450-694	63-93
採材農場数	17	4	9

1) CDの分離・同定

採材した鶏の腸内容物0.5gと99%エタノール1mlを混和し、室温で1時間反応したものをニッスイプレート CCMA培地EX(NISSUI PHARMACEUTICAL, Tokyo, Japan)に0.1ml接種し37°C, 72h嫌気培養した[3]。発育したコロニーのうち、培地が黄変したR型のコロニーを選択し、強化クロストリジア寒天培地(Biokar Diagnostics, Beauvais, France)で24-48h純培養した。

発育したコロニーを用いてPCR法を実施した。positive controlとして、ATCC BAA-1870株(KWIK STIK™, Microbiologics, U.S.A)を用いた。滅菌PBSにMf 0.5~1.0程度に懸濁し、100°C 10minで熱抽出、13000 ×g 10 min遠心し、遠心上清をDNA templateとした。

16S rDNAをターゲットとし、PCRによりCDを同定した。PCRは反応液の全量を25 μlとした。Quick Taq HS DyeMix(TOYOBO, Osaka, Japan) 12.5 μl, Water 11 μl, 12.5 μMに調製したforward primerとreverse primerを各0.5 μl, DNA template 0.5 μlを混和した。使用したprimerを表2に示す。DNAの増幅反応は94°C 2minに続いて、94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 2minのサイクルを35サイクル行い、最後に72°C 2minの反応を行った。

表2 使用したprimer

標的遺伝子	primer	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ(bp)	参考文献
16S rDNA	CIDIF-F	CTTGAATATCAAAGGTGAGCCA	1085	[4]
	CIDIF-R	CTACAATCCGAAGCTGAGAGTA		
<i>tcdA</i>	NK11	TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAAC	1266	[5]
	NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA		
<i>tcdB</i>	NK104	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	204	[6]
	NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT		
<i>cdtA</i>	<i>cdtA</i> pos	TGAACCTGGAAAAGGTGATG	376	[6]
	<i>cdtA</i> rev	AGGATTATTTACTGGACCAITTTG		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB</i> pos	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	511	[6]
	<i>cdtB</i> rev	AACGGATCTCTTGCTCAGTC		

3) 毒素遺伝子検出

2)で抽出したDNAを用いて毒素遺伝子をPCRにより検出した。toxinA(*tcdA*), toxinB(*tcdB*), binary toxin(*cdtA*, *cdtB*)について、2)と同様の反応液組成で行った。使用したprimerを表2に示す。DNA増幅反応は、*tcdA*および*tcdB*は94°C 2minに続いて、94°C 30sec, 60°C 30sec, 78°C 2minのサイクルを35サイクル行い、最後に78°C 2minの反応を行った。*cdtA*および*cdtB*は94°C 2minに続いて、94°C 30sec,

60°C 30sec, 72°C 1minのサイクルを35サイクル行い、最後に72°C 1minの反応を行った。

4) 薬剤感受性試験

2)で分離したCDについて、E-test(bioMèriex, C raponne, France)を用いて薬剤感受性試験を実施した[7]。薬剤はバンコマイシン(VA), メトロニダゾール(MZ), クリンダマイシン(CM)の3種類を供試した。嫌気性菌用ABCMBロス(EIKEN CHEMICAL, Tokyo, Japan)にMf1.0に調製し, GAM寒天培地(NISSUI PHARMACEUTICAL, Tokyo, Japan)に塗抹した。培養および判定は添付の説明書に従って実施した。

結果

1) 保菌率調査の成績

各処理場から得られたCD保菌率を表3に示す。300検体中14検体から合計30株が得られた。処理場Aでは6検体から11株, 処理場Cでは8検体から19株が分離された。処理場BからCDは分離されなかった。

表3 処理場毎のCD保有率

	陽性数 /サンプル数	陽性率 (%)	陽性農場数 /採材農場数
処理場A	6/160	3.8	6/17
処理場B	0/40	N. D.	0/4
処理場C	8/100	8	3/9

2) 毒素遺伝子保有状況

分離された30株の毒素遺伝子PCRの結果を表4に示す。処理場AでCDが分離された6検体中5検体から毒素遺伝子陽性株が分離された。処理場Cから分離された株からは毒素遺伝子は検出されなかった。

3) 薬剤感受性

分離された30株のうち18株(処理場A:10株, 処理場C:8株)を用いて実施した薬剤感受性試験の結果を表5に示す。処理場Aから分離された株からはVA, MZ, CMいずれも耐性を示さなかった。処理場Cで分離された株からはVA, MZについては耐性を示さなかったが, CMについては1株耐性を示した。

表4 毒素遺伝子保有状況

鶏No.	コロニーNo.	日 齢	<i>tcdA/tcdB/ binary toxin</i>	
	1		-/-/-	
	2		-/-/-	
20	3	47	+/+/-	
	4		-/-/-	
	5		+/+/-	
処理場A	39	1	47	+/+/-
	85	1	47	+/+/-
	94	1	48	-/-/-
	228	1	47	+/+/-
	242	1, 2	47	+/+/-
	41	1	64	-/-/-
	43	1	64	-/-/-
	48	1~4	64	-/-/-
処理場C	119	1	93	-/-/-
	214	1, 2	85	-/-/-
	216	1~6	85	-/-/-
	218	1~3	85	-/-/-
	219	1	85	-/-/-

表5 薬剤感受性

抗菌薬	ブレイク ポイント	MIC(μ g/ml) Range		耐性株数(n=18)	
		処理場A	処理場C	処理場A	処理場C
バンコマイシン	≥ 32	0.5-1.0	0.38-0.75	0	0
メトロニダゾール	≥ 32	0.064-0.125	0.094-0.19	0	0
クリンダマイシン	≥ 8	0.064-1.5	0.064->256	0	1(12.5%)

考 察

今回、鶏について、管内大規模食鳥処理場におけるCD保有状況を調査した。その結果、複数の農場からCDが分離されたことから、鶏の消化管内に潜在的に保菌していると考えられる。また、毒素遺伝子保有株が鶏の消化管内に分布することも明らかとなったため、鶏由来CDがヒトへ感染した場合病原性を示す可能性がある。そのため、解体・加工時の衛生的取り扱いの徹底がヒトへの感染予防に重要である。

今回の調査において、比較的日齢の低い処理場A, CからはCDが分離された一方、日齢の高い採卵鶏からは分離されなかった。このことは、日齢が高いほど保菌率が低下するという報告と一致する[9]。そのため、日齢の低いブロイラーでのリスクが高いと考える。

治療薬であるバンコマイシン，メトロニダゾールに対して耐性を示さなかったが，CDの薬剤感受性を保つためにも，抗菌薬の慎重使用が求められる。[10, 11]。

CDは日本においても近年注目されてきているが，海外に比べるとデータが少なく，特に動物・食品での分布は不明なことが多い。また，国内外で動物から高い病原性を示す株が分離されており，動物からヒトへの伝播が懸念されている[8, 9, 11]。今後は牛や豚での保菌状況調査やリボタイピングなどの遺伝学的検査などを実施することにより，動物における分布やヒトとの関連性等を調査していきたい。

参 考 文 献

- [1]Centers for Disease Control and Prevention : Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013[cited 2022 JUNE 8] <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- [2] Usui M, et al. : Prevalence and characterization of *Clostridioides difficile* isolates from retail food products (vegetables and meats) in Japan. *Anaerobe* 2019;61:102132
- [3] Asai T, et al., *Clostridium difficile* isolated from the fecal contents of swine in Japan. *J Vet Med Sci* 2013;75:539-41
- [4] Eisaku K, et al., Design of Species-Specific Primers to Identify 13 Species of *Clostridium* Harbored in Human Intestinal Tracts. *Microbiol. Immunol.* 2002;46:353-358
- [5] Kato H, et al., Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2178-82
- [6] Stubbs S, et al., Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186:307-12
- [7] L. T. Erikstrup, et al., Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clin Microbiol Infect.* 2012;E266-72
- [8] Usui M, et al., Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front Microbiol.* 2014;5:513
- [9] Abdel-Glil MY, et al., Presence of *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat in Egypt *Anaerobe.* 2018;51:21-25
- [10] Clostridioides (*Clostridium*) *difficile* 感染症診療ガイドライン [cited 2022 APR 1] www.chemotherapy.or.jp/guideline/cdi_shinryou.pdf
- [11] 臼井 優, 原田 倫子, 川端 楓実, 佐藤 友美, 樋口 豪紀, 田村 豊 成牛及びび子牛における *Clostridium difficile* の保菌状況 *日獣会誌* 2017;71:261-265

と畜場出荷豚における豚呼吸器複合病 (PRDC) 関連病原微生物の検出と分子系統樹解析

平島宜昌 坂口善二郎¹⁾ 山田耕一²⁾ 宇都誠二

阿久根食肉衛生検査所 1) 農政部畜産課 2) 串木野食肉衛生検査所

はじめに

豚呼吸器複合病 (PRDC) は、飼養環境の変化に伴う豚の免疫力低下を背景に、*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) 等のマイコプラズマ、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、豚サーコウイルス2型 (PCV2)、豚インフルエンザウイルス (SIV)、豚サーコウイルス3型 (PCV3) 等のウイルス、*Pasteurella multocida* (Pm)、*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) 等の細菌を含むPRDC関連病原微生物が複合的に感染して発症する。PRDC対策として農場外からの病原体の侵入防止、特に遺伝学的系統の異なる株の新たな侵入を防ぐことは重要である。と畜場は、多くの農場から豚が集まる「家畜集合施設」であり、出荷豚の病原微生物保有状況を遺伝学的系統まで含めて調査することは、農場への侵入防止対策に有効と考えられる。そこで今回、出荷豚の肺からPRDC関連病原微生物を検出するとともに、検出されたウイルスの分子系統樹解析を実施したので報告する。

材料及び方法

2021年8月から2022年2月にかけて、管内と畜場に出荷され、と畜検査を実施した出荷豚のうち、5県18農場の豚207頭について、村田らの報告[1]に基づき、肺表面の境界明瞭な肝変化 (MPS様病変) の病変部面積10%を指標に「10%未満群 (97検体)」と「10%以上群 (110検体)」にグレード分類し、肺を採取した。なお、病変グレードについては、山田らの方法[2]により音声入力した。採取したMPS様病変部の10%乳剤を作製後、DNA又はRNAを抽出し、PRRSV[3]、PCV2[4]、PCV3[5]、SIV[6]及びMhp[7]を検出するプライマーセットを用いてRT-PCR又はPCRを実施した。なお、PRRSV、PCV2及びPCV3を検出した場合は、追加のRT-PCR又はPCR[8, 9]を実施後、塩基配列を決定し、近隣結合法による分子系統樹解析を実施した。また、MPS様病変部を5%羊血液加寒天培地及びビョコレート寒天培地にスタンプし、37℃、24~48時間ローソク培養を実施した。分離菌株については、グラム染色を施して鏡検後、Pm又はAppを疑うグラム陰性桿菌を認めた場合は、それらを検出するプライマーセット[10, 11]を用いてPCRを行い、分離菌株を同定した。

成績

PRRSVは10農場 (55.6%)、17検体 (8.2%)、PCV2は15農場 (83.3%)、70検体 (33.8%)、PCV3は14農場 (77.8%)、33検体 (15.9%)、SIVは1農場 (5.6%)、1検体 (0.5%)、Pmは12農場 (66.7%)、36検体 (17.4%)、Appは2農場 (11.1%)、2検体 (1.0%)、Mhpは18農場 (100.0%)、73検体 (35.3%)、それぞれ検出された【表】。

表 MPS様病変部におけるPRDC関連病原微生物の検出状況 (18農場, 207検体)

	農場		個体	
	検出数	検出率 (%)	検出数	検出率 (%)
PRRSV	10	55.6	17	8.2
PCV2	15	83.3	70	33.8
PCV3	14	77.8	33	15.9
SIV	1	5.6	1	0.5
Pm	12	66.7	36	17.4
App	2	11.1	2	1.0
Mhp	18	100.0	73	35.3

2種類以上のPRDC関連病原微生物は、MPS様病変10%以上群110検体中44検体 (40.0%)、10%未満群97検体中19検体 (19.6%) で検出され、その検出率 (複合感染率) は10%以上群が10%未満群に比較して有意に高かった。検出されたPRDC関連病原微生物の組み合わせは多様であった【図1】。

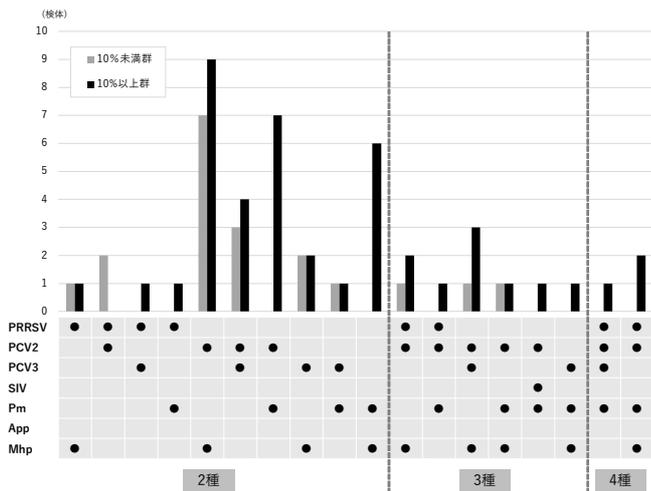


図1 PRDC関連病原微生物の複合感染状況

分子系統樹解析に供したPRRSV (9検体) は2つのクラスター (クラスターII及びIV) に、PCV2 (65検体) は2つの遺伝子型 (PCV2b及びPCV2d-2) に、PCV3 (25検体) は3つの遺伝子型 (PCV3a1, PCV3a2及びPCV3b2) にそれぞれ分類された【図2】。

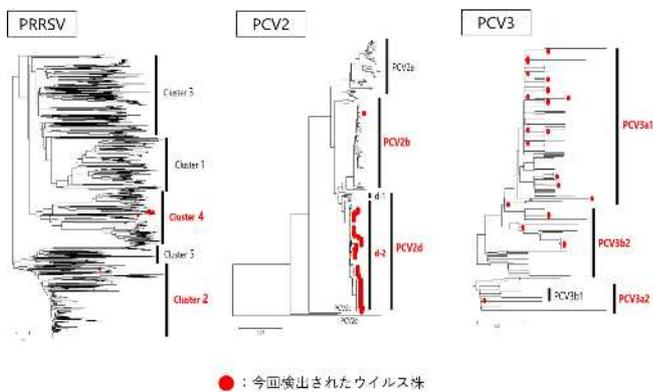


図2 分子系統樹解析 (PRRSV, PCV2, PCV3)

考察

MPS様病変部から多種のPRDC関連病原微生物が検出され、10%以上群では複合感染が有意に多く、検出された病原微生物の組み合わせは多様であった。このことから、PRDCの病態進行には単一の病原体だけでなく、多種の病原微生物が複合的に関与していることが改めて確認された。また、検出されたウイルスは複数の遺伝子型に分類され、と畜場出荷豚が多様な遺伝学的系統の病原微生物を保有しているこ

とが明らかとなった。過去の報告から、新たなウイルス株が農場に侵入すると、その抗原性や病原性の違いにより、たとえ浸潤農場であっても初侵入時と同様の流行が起こりうること[12]、また、輸送トラック (運転席内部、タイヤ周り、荷台等) や作業者の作業服及び長靴等に付着した病原微生物が農場への侵入経路になること[13]が示唆されている。したがって、従来からと畜場で行われている輸送トラックの洗浄及び消毒の徹底とともに、生産者や関係者がと畜場内専用の長靴や作業着を使用する等、と畜場における交差汚染防止対策を行うことは、農場への病原微生物侵入防止に重要と考えられた。

参考文献

- [1] 村田純哉, 高杉幹男, 齋藤立 : 臨床獣医, 22, 47-51 (2004)
- [2] 山田耕一, 中島靖剛, 東原敏秋 : 平成27年度食肉衛生検査所業務概要, 93-96 (2015)
- [3] Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK et al. : J Clin Microbiol, 33, 1730-1734 (1995)
- [4] Kawashima K, Katsuda K, Tsunemitsu H : J Vet Diagn Invest, 19, 60-68 (2007)
- [5] Palinski R, Piñeyro P, Shang P et al. : J Virol, 91, e01879-16 (2016)
- [6] Lee MS, Chang PC, Shien JH et al. : J Virol Methods, 97, 13-22 (2001)
- [7] Mattsson JG, Bergström K, Wallgren P et al. : J Clin Microbiol, 33, 893-897 (1995)
- [8] Wesley RD, Mengeling WL, Lager KM et al. : J Vet Diagn Invest, 10, 140-144 (1998)
- [9] 平島宜昌, 坂口善二郎, 北原尚英ら : 日獣会誌, 72, 339-343 (2019)
- [10] Kumar S, Stecher G, Tamura K : Mol Biol Evol, 33, 1870-1874 (2016)
- [11] Townsend KM, Frost AJ, Lee CW et al. : J Clin Microbiol, 36, 1096-1100 (1998)
- [12] 恒光裕 : ウイルス, 59, 167-178 (2009)
- [13] 藤岡舞, 白井彰人, 平島宜昌ら : 獣畜新報, 69, 343-348 (2016)

牛の呼吸器疾患と枝肉重量の関係性

神田卓弥 窪菌薫 篠原謙二 中島靖剛
末吉食肉衛生検査所

はじめに

肥育牛の呼吸器疾患は増体の低下、肉質の低下等を生じる経済的損失の大きい疾病である。特に、複数のウイルスや細菌が複合的に感染して生じる牛呼吸器症候群(BRDCs)は肥育農家の経済的損失につながるため近年問題となっている。そこで、将来的にフィードバックを実施するため、と畜検査における牛の肺炎の基礎データとして、病理検査による評価、微生物検査による病原微生物の検出、枝肉重量を用いた生産性との関連性について調査した。

材料と方法

1. 検体

令和3年4月～翌年4月の期間で、25の農場から、無作為に101頭の牛から肺を採材した。病理検査の材料として肺の全体像を写真で記録し、右肺前葉、左肺後葉を採材し、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬し固定した。微生物検査の検体として右肺前葉の一部を-80℃で保存した。

2. 病理検査

肉眼病変としてそれぞれの肺の写真から4つの肉眼病変（胸膜炎、カタル性肺炎、化膿(乾酪)性肺炎、小葉間結合組織増生）について、有無を調べた。固定した材料は定法に基づき、パラフィン包埋後、厚さ2μmの切片を作成後、HE染色を実施した。気管のリンパ濾胞(BALT)の過形成、間質への

炎症性細胞浸潤、線維化や肝変化等の所見を参考に観察を行った。

3. 微生物検査

採材した肺から0.1g程度を採取した後、Tris-EDTA 200μLを加え、100℃で7分加熱しDNAを抽出した。RNA抽出には、QIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用いた。

BRDCsの主要な原因として知られる *Mycoplasma bovis*(Mb), *Pastuerella multocida*(Pm), *Histophilus somni*(Hs), 牛ヘルペスウイルス(BoHV), 牛RSウイルス(BRSV), 牛パラインフルエンザIIIウイルス(BPI3V)の保有状況を確認するため、表1に示すプライマーを用い、RT-PCRとLAMP法を行った。

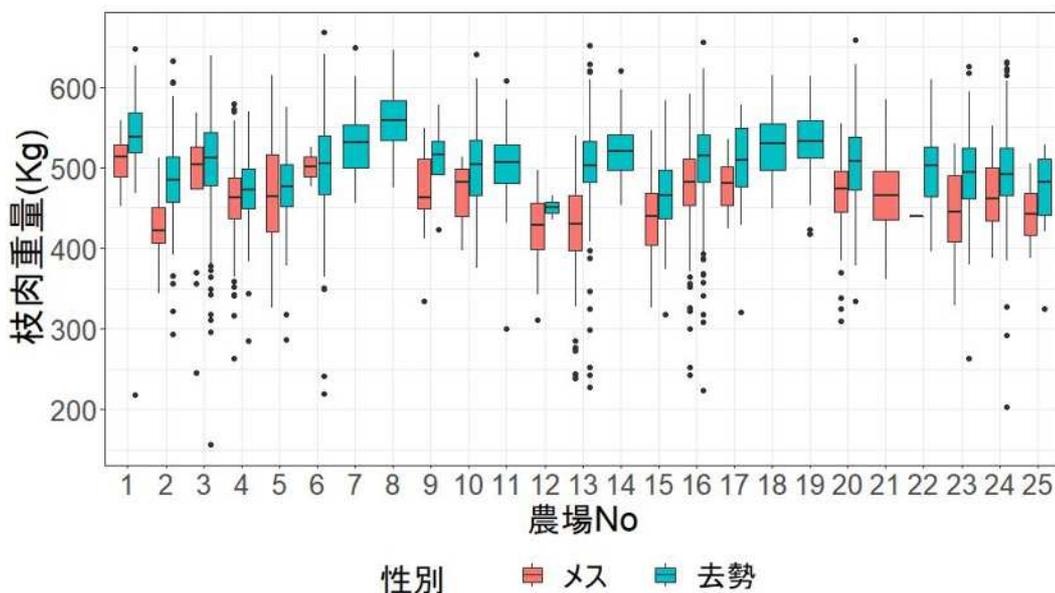


図1 枝肉重量分布(枝肉・性別)

表 1 各病原体の検査法

略称	病原体 ----- 検出法	プライマー	引用
Mb	<i>M. bovis</i> ----- LAMP	F3 CCATCTAGCACATTTTTTCCT B3 TCTAATTCGTCAAAAGTGACAT FIP TGAGCTTCCATTGTTTGTCTACTAATTGACTTTAAGTTTGACTGG BIP ATGAGATGTAACACAGATCACATTATTCTAACTGCGCTTG LF AAGAAACAAAATTTTCATCAATAGA LB ATGGCTTCTATTACGAAAAGCAA	[6]
Pm	<i>P. multocida</i> ----- LAMP	F3 GAATCAAGCGGTCACAG B3 CACTCACAACGAGCCATA FIP AGAGCAGTAATGTCAGCACAATATTAAGACAGCAATTTGAGCA BIP CGCTATTTACCCAGTGGGGCGCCATTTCCCATTTCAAGTG LF CGTAAAGCCCCACCATTGTT LB ACCGATTGCCGCGAAATTGAGT	[8]
Hs	<i>H. somni</i> ----- LAMP	F3 AGTAATGTAAC TTGGCAAAT B3 GCAATAATTTGACTTTCTTGAGG FIP CACTTGTTGTGTATAGTCAGCACTTCGGTTAATGAGTTACAAAATCG BIP ATGCACAGGGAAAAAATACAGCTGTTTCATTGTCCATACGAAAT LF ACACATCAATTTTATTTAA LB GGAAAAATACAAC TCAAACGT	[8]
BoHV	牛ヘルペスウイ ルス ----- LAMP	F3 TACTGGCTCATGTTTCCC B3 CTGCTGGTGAAAAGTTCCC FIP TCGTTAAGCTTCCGCACAAC TGTGAGGTAGAAGCGGTC BIP TGTTCCGTCGTAAAGCTGACGGTTCACTTTGAATGTGTTCCC LF AGACGAGTGCTACGAGGA LB AAAGA ACTGCAGCGGTCG	[2]
BRSV	牛RSウイルス ----- 1step RT-PCR	Fw ACACATCAATYCAAAGCACCACAC Rev GCTRGTCTGTGGTGGRITGTTGTC	[9]
BPI3	牛パラインフルエ ンザ3ウイルス ----- 1step RT-PCR	Fw TGTCTTCCACTMGATAGAGGGATAAAATT Rev CCTTTTTCATCTAGAATCTGAACTACTCC/ CCTTTCTCATCTAAGATCTGGACMACC	[9]

4. 統計解析

枝肉重量は、農場や性別による影響を受けることを考慮し（図1），右の計算式をもとに枝肉重量を標準化(Z-score normalization)し、Z_weightとして R 4.2.1 (<https://www.r-project.org/>)により統計解析を行った。

$$Z_weight = \frac{(Weight - Ave)}{SD} \dots (式)$$

Z_weight : 標準化枝肉重量 Weight : 枝肉重量
Ave:平均 SD : 標準偏差

結 果

1. 病理検査

i) 肉眼所見

101頭の肺において胸膜炎(図2a), カタル性肺炎(図2b), 化膿(乾酪)性肺炎(図2c), 小葉間結合組織増生(図2d)の所見を, それぞれ31頭, 24頭, 2頭, 3頭で認めた(表2)。

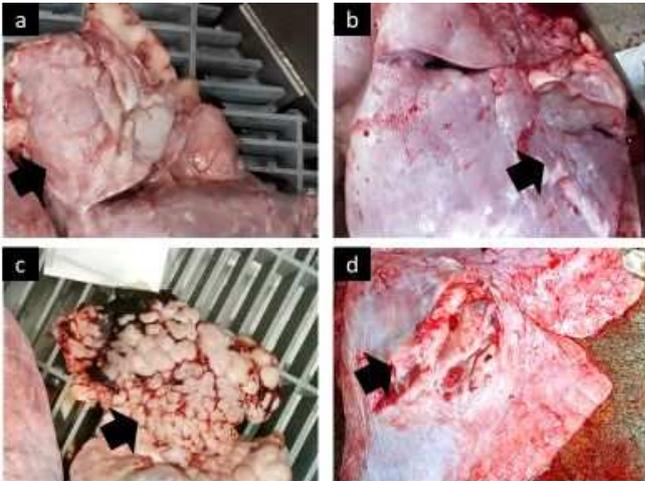


図2 主要な肺病変

- a : 肺漿膜面に繊維素沈着(胸膜炎)とカタル性病変
- b : 暗赤色の水腫性病変(カタル性肺炎)
- c : 内部に粘液を有する結節状病変(化膿性肺炎)
- d : 小葉間結合組織の肥厚

表2 肉眼所見

肉眼所見	カタル性肺炎	胸膜炎	化膿(乾酪)性肺炎	結合組織増生
	頭数	31	24	2

ii) 組織所見

BALTの過形成(図3A)を認めた牛は53頭(52%), 間質への炎症性細胞浸潤(図3B)は40頭(30%)で認められた。

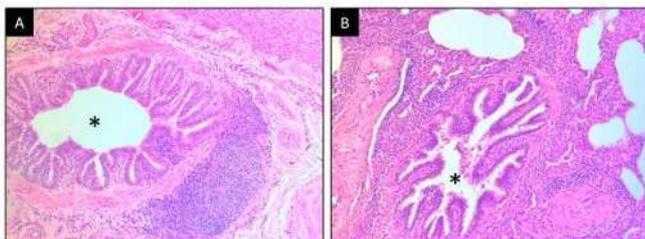


図3 組織所見

- A : 気管(*)周囲のリンパ濾胞の過形成
- B : 間質への炎症性細胞浸潤

2. 微生物検査

21頭の右肺前葉から病原体が検出され, 各病原体の保有率は表3のとおりであった。

表3 各病原体の保有率 (n=101)

病原体	Mb	Pm	Hs	BoHV	BRSV	BPI3
保有率	19%	4%	1%	0%	0%	1%

病原体が検出された21頭のうち, 単独感染は18頭で, 残り3頭の牛でBRDCs関連病原体が複数種検出された。複合感染した牛からはMb, Pmが共通して検出された(表4)。

表4 保有状況 (n=101)

単独感染	1菌種	18%(Mb 16% Pm 2% PI3 1%)
複合感染	2菌種	2%(Mb+Pm)
	3菌種	1%(Mb+Pm+Hs)

3. 各病変での組織所見と病原体保有状況

i) カタル性肺炎

カタル性肺炎罹患群(31/101頭)において, Mb保有, BALTの過形成, 間質への炎症性細胞浸潤に有意な差を認めた(表5)。

ii) 胸膜炎

胸膜炎罹患群(24/101頭)においては, いずれも有意差は認められなかった(表6)。

表5 カタル性肺炎と組織所見及び病原体保有

	カタル性肺炎		
	- (n=70)	+(n=31)	p-value*
Mb			
-	61	21	0.03
+	9	10	
Pm			
-	68	29	0.58
+	2	2	
BALTの過形成			
-	40	8	<0.01
+	30	23	
間質への炎症性細胞浸潤			
-	57	14	<0.01
+	13	17	

*fisher's exact test

表6 胸膜炎 と組織所見及び病原体保有

	胸膜炎		p-value*
	-(n=77)	+(n=24)	
Mb			
-	64	18	0.38
+	13	6	
Pm			
-	74	23	>1.00
+	3	1	
BALTの過形成			
-	39	9	0.35
+	38	15	
間質への炎症性細胞浸潤			
-	57	14	0.20
+	20	10	

*fisher's exact test

4. 枝肉重量との関連性

i) 肉眼所見との比較

肺病変が認められた群のZ_weightは-0.02，肉眼病変を認めなかった群は0.06で，わずかに減少していたが(図4)，有意差は認められなかった(p=0.3)。

・カタル性肺炎

罹患群はZ_weight=0.08，非罹患群は-0.02で，有意差は認められなかった(表7，図4)。

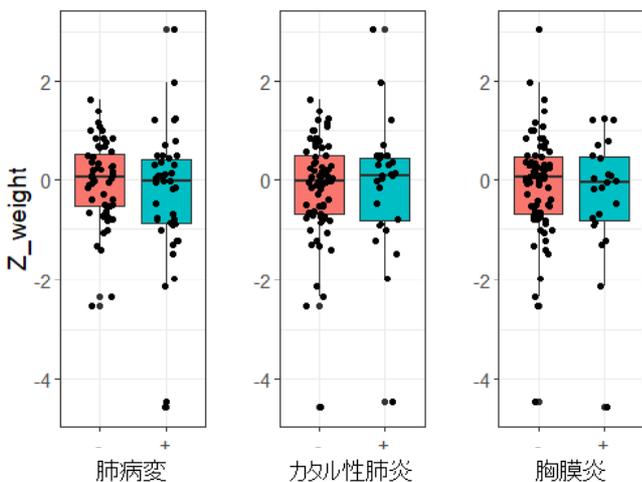


図4 肉眼所見の有無とZ_weight

表7 Z_weightの平均の比較

	n	Z_weight		p-value*
		Ave (Min,Max)		
カタル性肺炎	+	31	0.08 (-0.81, 0.45)	>0.9
	-	70	-0.02 (-0.67, 0.49)	
胸膜炎	+	24	-0.06 (-0.80, 0.47)	0.5
	-	77	0.06 (-0.69, 0.49)	
Mb	+	19	0.2 (-0.40, 0.71)	0.2
	-	82	0.02 (-0.76, 0.37)	

*Welch Two Sample t-test

・胸膜炎

罹患群のZ_weightの平均は-0.06，非罹患群では0.06で，胸膜炎群で枝肉重量は減少していたが有意差は認められなかった。(表7，図4)

ii) 病原体保有との比較

・ Mb

Mb保有群のZ_weightの平均は0.2，非罹患群では0.02で，枝肉重量は，Mb保有群が枝肉重量は重い傾向であったが有意差は認められなかった。(表7，図6)

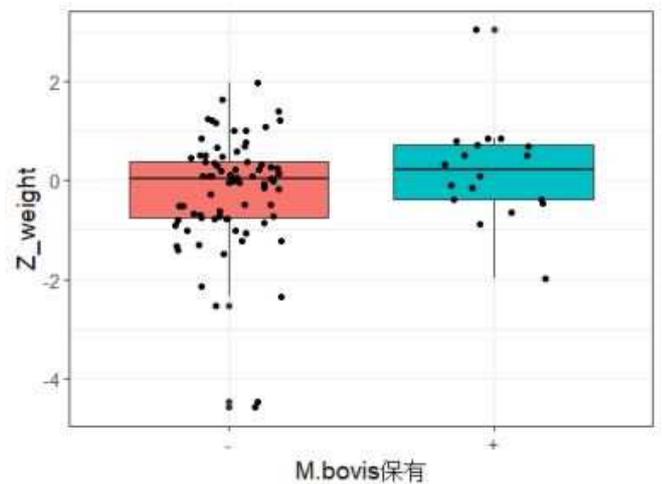


図6 Mb保有とZ_weightの関連

考察

カタル性肺炎では，BALTの過形成，間質への炎症性細胞の浸潤が有意に認められ，病原体の感染が強く疑われた。右肺前葉に繋がる気管の気管支は気管の一番初めの分岐でやや腹側に開口しているため誤嚥により細菌が到達しやすい。気管支肺炎は肺の前葉で認めることが多いとの報告もあり[4]，今

回、肺炎になりやすい右肺前葉を検体としたが、通常搬入される牛を対象としたため、ほとんどが組織の変化は軽度もしくは限局しており、枝肉重量との関連性を示すに至らなかった。今後は臨床的に呼吸器症状を呈する牛も含めた調査が必要であると感じた。

Mbの保有率は19%で、過去の調査と同等程度であったが[3, 6], Pm, Hs, BoHV, PI3V, BRSVの保有状況はかなり低い結果となった。

国内ではMbに有効なワクチンはないが、その他の保有率の低かった病原体についてはワクチンにより感染が抑えられ、農場の汚染が減少したのではないかと推察した。複数の病原体が検出された牛ではいずれもMbが検出され、MbがBRDCsへの関与がうかがわれた。Mbはワクチンがない上に、有効な抗生剤が少ないため治療が難しい。Mb頻発農場においては、予見的治療が有効であるために[10], BRDCsの病原体のデータのフィードバックは農場の有益な情報になると思われる。豚呼吸器症候群においては、呼吸器疾患と病原体の有無で損失が出る事が知られており、病原体の有無・複合感染による損失アセスメントが行われている[5]。今回の牛を対象にした調査では、肺病変、病原体の保有の有無が枝肉重量に関与しているかについては明らかに出来なかったが、枝肉重量が著しく低い牛に肺病変が認められる傾向があった。一方で、肺病変があるものの枝肉重量が最大となっている牛もみられたが、この要因としては、と畜時の肺病変が必ずしも増体に影響を与える時期、期間での肺疾患を反映するものではないことがあげられる。

通常搬入される牛の多くは、と畜時に呼吸器病変を認めない。ワクチネーションや早期の治療により回復した後、適切な飼養管理を受けたことによるものと考えられるが、NOSAIの統計資料において、呼吸器疾患は、いまだ肥育牛の廃用や治療の主要因の一つとなっている[1]。

呼吸器疾患の原因である病原体の特定は、治療に有用な情報である。今回の調査では、遺伝子検査を用いることなく、肉眼病変から病原体をある程度推定できると期待していたが、本調査ではそれは難し

かった。

今後、調査方法を再度見直し、継続して調査を行い、肉眼病変に基づく呼吸器疾患のスコアリングについて検討したい。

引用

- [1] https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/katiku_kyosai/index.html
- [2] Deborah Peltzer, Kurt Tobler, Cornel Fraefel., *et al.* 2021. *J Virol Metho*, 289, 11401
- [3] 藤長悠太, 神田卓弥, 外園千代ら 2017. 鹿児島県業務概要
- [4] 播谷亮. 2017. 家畜感染症学会誌. 6 (4):139-147
- [5] Haden C, Painter T, Fangman T, *et al.* 2012. *AASV*
- [6] Higa Y, Uemura R, Yamazaki W., *et al.* 2016. *J. Vet. Med. Sci.* 78(8): 1343–1346,
- [7] 三城せいら, 上村涼子, 保田昌宏ら 2016. 第159回獣医学会学術集会
- [8] Mohan S, Pascual-Garrigos A, Brouwer H, *et al.* 2021. *ACS Agric Sci Technol*, 1:100–108.
- [9] Niroshan Thantrige-Don, Oliver Lung, Tara Furukawa-Stoffer., *et al.* 2018. 261,51-62
- [10] 上村涼子. 2016. 家畜感染症学会誌. 5 (1):11-20

管内と畜場で確認された気腫疽と悪性水腫の症例

中尾悠一郎 和田知美 猪俣生輝 岩下幸二
知覧食肉衛生検査所

はじめに

気腫疽、悪性水腫はともに *Clostridium* 属菌による細菌性疾病であり、気腫疽は *C.chauvoei* を、悪性水腫は *C.septicum*, *C.perfringens*, *C.sordellii*, *C.novy* を起因菌としている。両疾病ともに、創傷部等からの感染による四肢等の腫脹を特徴とした症状を呈するが、気腫疽は、家畜伝染病予防法上の届出伝染病であり、その鑑別が重要とされている。また、本県における両疾病の発生状況は、悪性水腫が年間数例見られるのに対し、気腫疽は平成27年以降発生報告がない。令和3年度、管内と畜場で、それぞれ気腫疽、悪性水腫と診断した事例に遭遇したので、その概要について報告する。

材料及び方法

症例1は、大腿骨骨折を主訴として緊急搬入された20ヶ月齢、雌の黒毛和種牛、症例2は腰椎骨折を主訴として緊急搬入された24ヶ月齢、去勢の黒毛和種牛であり、生体所見は、両症例ともに起立不能であった。両症例とも、筋肉出血及び病変部からの酪酸臭を認めたことから、炭疽、気腫疽、悪性水腫等を疑い、検査保留とし、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、その他筋肉病変部等の採材を行った。

病変部等塗抹標本のグラム染色、アスコリーテストにより炭疽を否定した後、羊血液寒天培地による細菌培養及びPCR検査並びに市販キットによる細菌同定を行った。

成績

症例1の解体検査では、両大腿部筋肉の出血と暗赤色変化並びに同部位で特徴的な酪酸臭及び捻髪音を認めた(図1, 2)。その他臓器には著変を認めなかった。

症例2では、左肩後部筋肉に症例1と同様の筋肉病変(図3)を認め、脾出血、第一胃出血、小腸炎、腸間膜リンパ節の出血及び腹膜炎に伴う各臓器漿膜面の炎症を認めた。

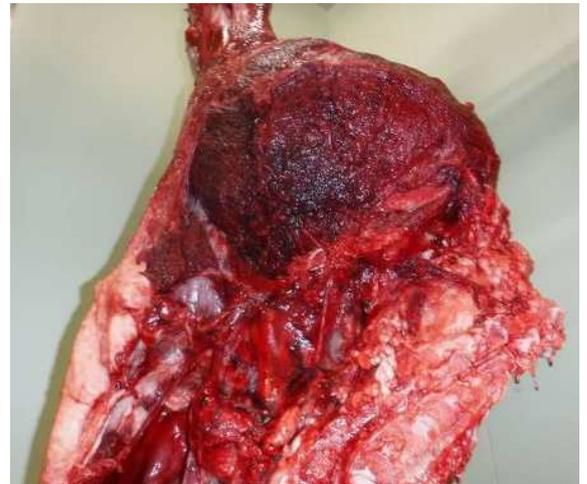


図1 症例1左大腿部

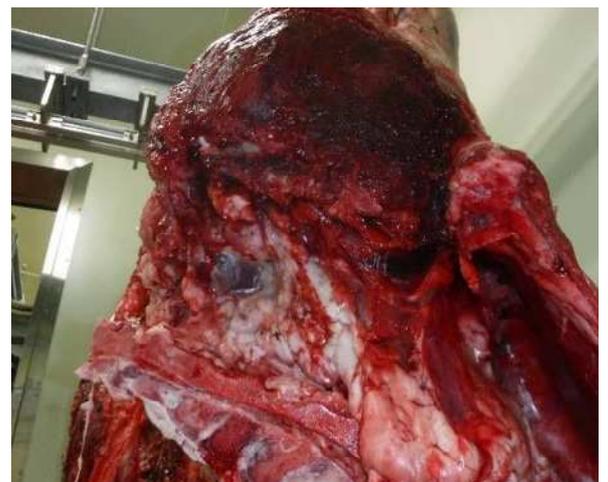


図2 症例1右大腿部



図3 症例2左肩部

細菌学的検査においては、症例1では溶血性のある非遊走性のグラム陽性嫌気性大型桿菌（図4）、症例2では溶血性のない著しい遊走性を示すグラム陽性嫌気性大型桿菌（図5）が分離された。



図4 症例1スタンプ培養（血液寒天培地）



図5 症例2画線培養（血液寒天培地）

芽胞の染色では、症例1でレモン状、スプーン状、楕円状の芽胞（図6）を、症例2で楕円状で菌体から膨隆した芽胞（図7）を認めた。Api RAPID ID32Aを用いた細菌試験では両菌とも*C. septicum*と判定され、PCR検査により、症例1分離菌は*C. chauvoei*（図8）、症例2分離菌は*C. septicum*（図9）と同定した。このことから、症例1を気腫疽、症例2を悪性水腫と判定〔1〕し、全部廃棄措置とし、施設には芽胞形成菌による汚染を想定した消毒の指示を行った。

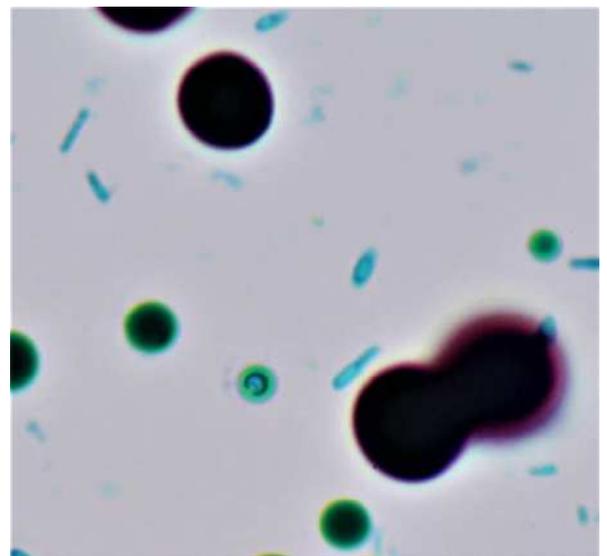


図6 症例1 ウィルツ芽胞染色

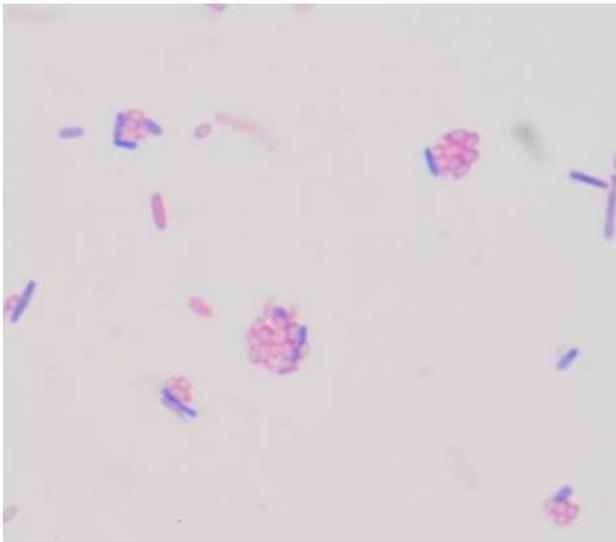


図7 症例2 グラム染色

変部筋肉の出血及び暗赤色変化等認め、塗抹標本にてグラム陽性大型桿菌を認めたため、炭疽の否定後、市販キット及びPCRによる同定を行ったが、市販キットでは両菌ともに*C. septicum*と同定され、*C. chauvoei*との鑑別を行うことはできず、PCR検査により鑑別が可能であった。

考 察

本県においては、今回の症例が、と畜場においては6年ぶりの気腫疽の発生であったが、本県の検査実施標準作業書にあるとおり、気腫疽と悪性水腫の鑑別には、培養コロニー形状及び染色態度並びに同定試験、PCR結果等を総合的に判断する必要があることが再確認できた。

参 考 文 献

- (1) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構：病性鑑定マニュアル、第4版、98-101, 150-152(2016)

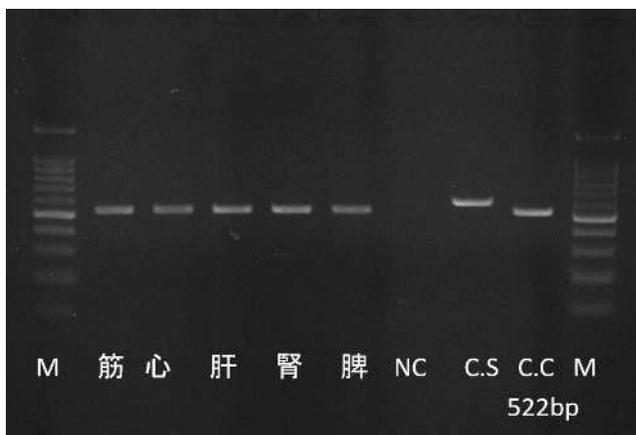


図8 症例1 PCR結果

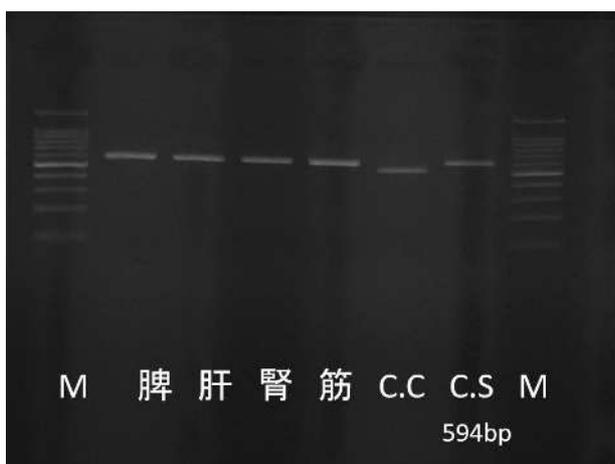


図9 症例2 PCR結果

ま と め

今回の2症例では、解体所見で酪酸臭を伴う病

と畜検査でみられた*Mycoplasma suis*による豚へモプラズマ病

日高遼太郎 岩元幸江 松元光春¹⁾ 宇都浩二
大口食肉衛生検査所 ¹⁾鹿児島大学共同獣医学部

はじめに

へモプラズマは赤血球に寄生するマイコプラズマ属の総称であり、豚へモプラズマ病(旧エペリスロゾン病)の原因として*Mycoplasma suis*及び*M. parvum*の2種が知られている[1]。*M. suis*感染豚では急性期に溶血性貧血、黄疸、発熱などの症状を引き起こすのに対し、*M. parvum*は不顕性感染が多いとされている[2, 3, 4]。また、へモプラズマは世界中に広く浸潤しており、発育遅延や繁殖率低下等により経済的損失を与えている[5]が、人工培養法が確立されていないなど詳細な研究が進んでおらず、病態に関する知見は限られている。今回、と畜検査で高度の黄疸と判定した肥育豚について*M. suis*による豚へモプラズマ病と診断したので概要を報告する。

材料と方法

(1)材料

2021年9月、高度の黄疸を疑い保留した肥育豚(約6ヶ月齢、交雑種、雌)から血液(心臓残血及び脾静脈血)、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、肺、小腸及び回腸リンパ節を採材し、以下の検査に供した。

(2)血液検査

血液塗抹標本にディフクイック染色を実施し鏡検を行った。寄生率は、赤血球を1,000個以上カウントして算出した。また、生化学検査としてスポットケム(SP-4430, arkray)を用いて血中総ビリルビン値(T-Bil)を測定した。

(3)細菌学的検査

心臓、肝臓、腎臓及び脾臓について5%羊血液加トリプトソイ寒天培地に直接スタンプし、ローソク培養並びに嫌気培養を48時間行った。

(4)遺伝子学的検査

脾臓及び肝臓の生材料からQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出し、豚へモプラズマの16S rRNA遺伝子を標的としたPCR[6]を実施した。得られた増幅産物についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列を調べ、BLAST検索を実施した。

(5)病理組織学的検査

常法に従い臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定後パラフィン切片を作製し、HE染色、鍍銀染色及びマツソンゴールドナー染色を実施した。さらに、脾臓については2.5%パラホルムアルデヒド及び2.0%グルタルア

ルデヒドで前固定、1%四酸化オスミウムで後固定後、Epon樹脂に包埋した。超薄切片に酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を実施し、透過型電子顕微鏡(H-7560, 日立製作所)により観察を行った。

(6)豚へモプラズマ保有状況調査

本症例以外で黄疸を疑い保留した豚3頭及びと畜検査に合格した豚13農場102頭の脾臓から同様にDNAを抽出後PCRを実施し、豚へモプラズマの保有状況を調べた。

結果

(1)肉眼所見

脂肪、可視粘膜、軟骨等全身性に黄変が認められた。脾臓は著しく腫大し、うっ血及び脆弱化が認められ、白脾髄は不明瞭であった(図1)。また、心筋の退色、心冠脂肪の融解、肝臓の腫大、退色及び線維化が認められた。

(2)血液検査

血液塗抹では、赤血球表面に球菌状又はリング状の原核微生物の付着が認められ(図2)、寄生率は17.8%であった。血漿は黄変しており、T-Bilは心臓残血で1.2 mg/dL、脾静脈血で4.1mg/dlであった。



図1 腸間膜脂肪の黄変と脾臓の著しい腫大

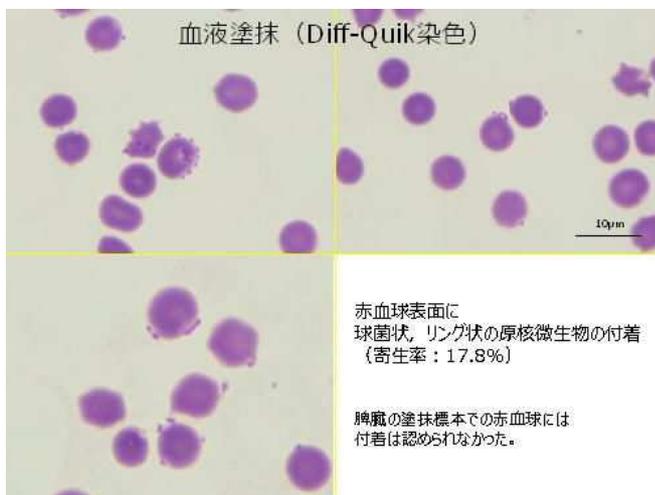


図2 赤血球表面に認められた原核微生物

(3) 細菌学的検査

ローソク及び嫌気培養ともに細菌の発育は認められなかった。

(4) 遺伝子学的検査

脾臓及び肝臓から *M. suis* に特異的なサイズの遺伝子増幅が認められ、増幅産物の396bpの塩基配列は過去に国内で報告された *M. suis* [7] と100%の相同性であった。

(5) 病理組織学的検査

脾臓では、赤脾髄が赤血球充満により拡張し、白脾髄及び脾柱が萎縮しており、マクロファージによる赤血球の貪食像が多数認められた(図3)。鍍銀染色では、細網線維の断裂及び消失が認められた。電顕下では、赤血球表面への菌体の付着は認められず、マクロファ

ージに貪食された赤血球の細胞質内に菌体が認められた(図4)。菌体は多くが均質無構造であったが、まれに電子密度の高い顆粒も認められた。肝臓では、小葉中心性の肝細胞壊死、類洞の拡張及び好中球の軽度浸潤が認められた。マッソンゴールドナー染色では、小葉間結合組織の増生、中心静脈周囲の線維化及び肝小葉の辺縁鈍化が認められた。その他臓器には著変は認められなかった。

脾臓 (HE染色)

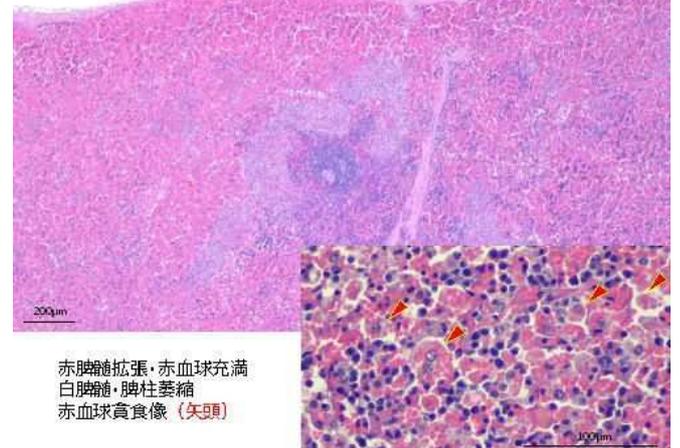


図3 脾臓の HE 染色像

脾臓 (TEM)

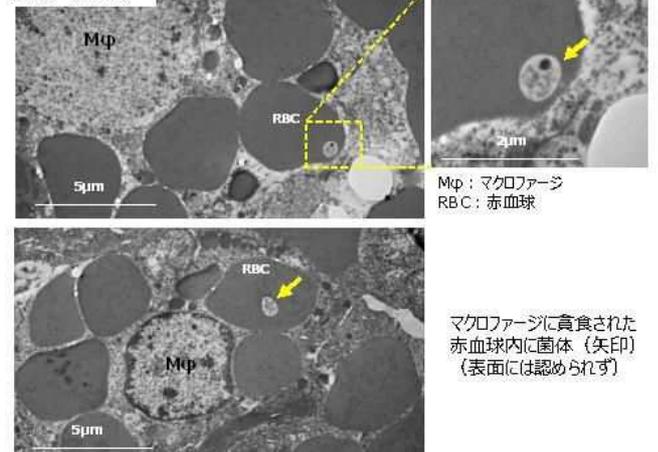


図4 脾臓の電子顕微鏡像

(6) ヘモプラズマ保有状況調査

黄疸を疑い保留した豚3頭は、いずれも黄変は軽度で血液塗抹や組織では著変は認められず合格としたが、2頭から *M. parvum* の遺伝子が検出された。と畜検査に合格した豚では6農場23頭 (*M. suis* 2頭, *M. parvum* 21頭) から豚ヘモプラズマの遺伝子が検出された。

考 察

以上の検査結果から本症例を *M. suis* による豚ヘモプラズマ病と診断した。過去の症例や実験感染では、重度の黄疸、脾腫及び肝臓の退色等が認められ、組織学的には脾臓の網内系活性化や肝臓の小葉中心性の肝細胞壊死が認められている[2, 8, 9]。本症例においても、黄疸は重度ではなかったが同様の病変が認められたことから、脾腫等を伴う黄疸の場合は豚ヘモプラズマ病である可能性がある。

一方、海外では養豚従事者から *M. suis* の遺伝子が検出されている[10]。本症例では、黄変度及びT-Bil値のみでは高度の黄疸とは認められなかったが、人獣共通感染症の病原体が全身に蔓延していることを考慮し全部廃棄処分とした。と畜検査において黄疸を呈する豚の判定に当たっては注意が必要と考えられた。

豚ヘモプラズマは感染耐過後も完全には消失せず、ストレス等により再発する[2]。本症例においても、発生と同時期に同じ農場の出荷豚で敗血症による全部廃棄や肺炎及び腸炎等による一部廃棄率が高くなっていたことから、豚ヘモプラズマ病の発生は農場の飼養衛生管理の失宜を示唆する指標としても重要と考えられた。

近年、豚ヘモプラズマ病の野外発生報告は少ないが、保有状況調査結果から現在も農場に広く潜在していることが示唆された。また、病原性が低いとされている *M. parvum* が、*M. suis* より高い保有率であったことや、黄疸の豚からも検出されたことなど不明な点が多く、今後も調査研究を継続していくことが必要である。

参 考 文 献

[1] Splitter, E. J.: *Eperythrozoon suis* n. sp. And *Eperythrozoon parvum* n. sp., two new blood parasites of swine, Science, 111 :

513-514(1950)

- [2] 石原忠雄: エペリスロゾーン病, 豚病学, 近代出版, 東京, 527-533(1977)
- [3] Hoelzle LE et al.: Pathobiology of *Mycoplasma suis*, The Veterinary Journal, 202 : 20-25(2014)
- [4] Groebel, K. et al.: *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes, In Infection and Immunity, 77 : 576-584(2009)
- [5] Ritzmann, M. et al.: Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings, Veterinary Microbiology, 133 : 84-91(2009)
- [6] Watanabe Y. et al.: Prevalence of Swine Hemoplasmas Revealed by Real-Time PCR Using 16S rRNA Gene Primers, J Vet Med Sci., 74:1315-8(2012)
- [7] Watanabe Y. et al.: Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes, J Vet Med Sci., 73:1657-1661(2011)
- [8] Stadler J. et al.: Clinical, haematological and pathomorphological findings in *Mycoplasma suis* infected pigs, BMC Vet Res., 10;17(1):214.(2021)
- [9] 森川聖二ら: 豚のエペリスロゾーン病について, 昭和62年度日本獣医公衆衛生学会講演要旨, 191-192(1987)
- [10] Yuan, C.L. et al.: Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China, American Journal of Veterinary Research, 70,890-894(2009)

管内食鳥処理場で確認されたマレック病と発生農場へのフィードバック

藤田朋絵 小出朋子¹⁾ 牧田万悠子 諸永純子 中島靖剛

末吉食肉衛生検査所, 1)徳之島保健所

はじめに

マレック病(MD)はMDウイルスの感染によりリンパ腫が誘発される届出伝染病で、適切な予防を行わないと経済的な損失が大きい。食鳥処理場や養鶏農家にとって重要な疾病である。家畜伝染病予防法に基づくMDの届出羽数は平成11年の14,688羽をピークに減少傾向にあり、本県の食鳥処理場におけるMDによる全部廃棄も平成8年度の99,150羽をピークに減少し、近年ではほとんど見られなくなっている。

今回、当検査所が管轄する食鳥処理場においてMDが散発する農場が確認されたことから、食鳥検査員や食鳥衛生管理者に対して研修等を行うとともに、農場へも情報提供を行ったので概要を報告する。

近況

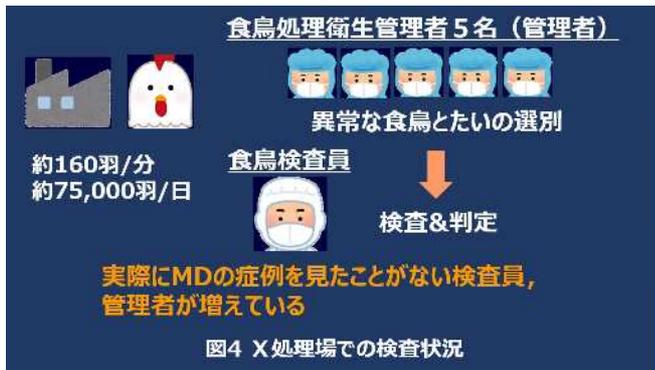
国内でのMDの発生届出数は、年によって増減が見られるものの平成11年をピークに減少傾向にあるが、令和3年は約8,200羽にまで上昇している(図1)。

一方、県内食鳥処理場でのブロイラーのMDによる全部廃棄羽数についても、平成8年度の約99,150羽をピークに平成16年度以降は500羽以下となっている(図2)。

当検査所で管轄しているX食鳥処理場においても、近年MDが確認されることはほとんどなかったが、令和4年2月から5月に3農場でMDが疑われる症例の散発がみられた(図3)。

当該処理場では、1日あたり約75,000羽(約160羽/分)のブロイラーが処理されており、5名の食鳥処理衛生管理者(以下、管理者)と食鳥検査員(以下、検査員)で検査に当たっているが、近年、MDの発生がほとんどみられないことから、実際にMDの症例に触れた経験のない管理者や検査員が多くなっている(図4)。





材料及び方法

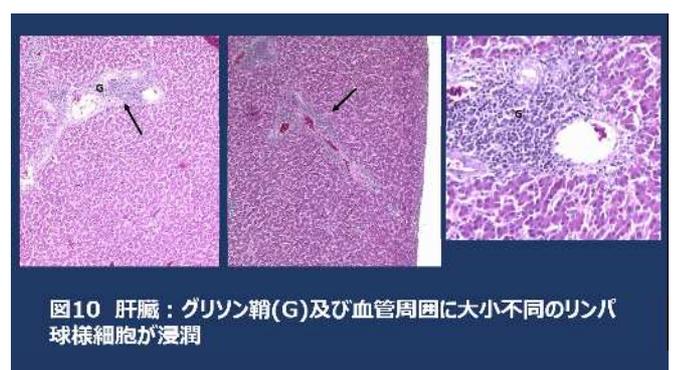
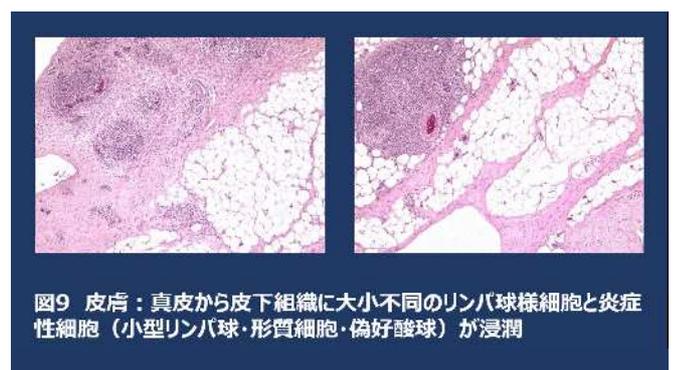
MD が疑われたブロイラーの心臓、肝臓、脾臓、腎臓、腺胃、皮膚及び坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法により組織切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

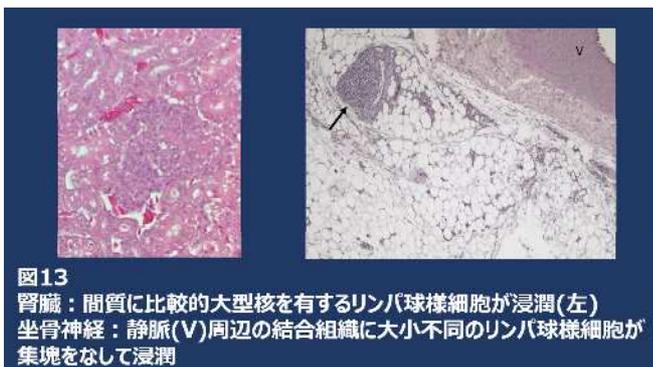
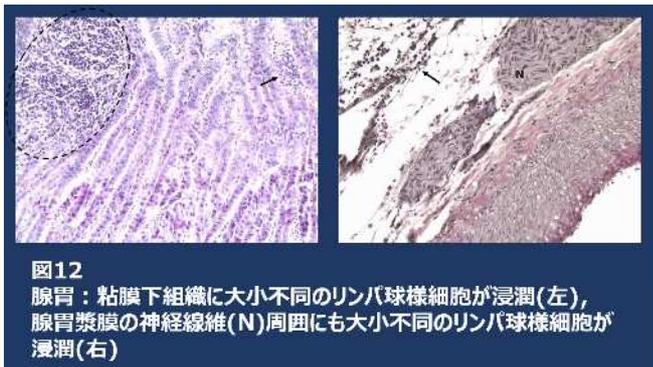
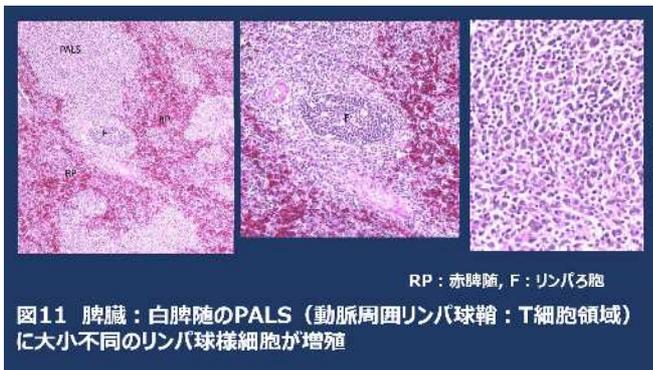
また、ホルマリン固定した脾臓と皮膚を材料に innuPREP DNA Mini Kitを用いてDNAを抽出し、meq 遺伝子を標的としたPCRを実施した。

結果

肉眼的所見では、羽包の腫脹(一部に出血を伴う)や脾臓の腫大と白斑、腎臓の腫大と褪色、腺胃壁の肥厚が認められた(図5～図8)。

病理組織学的に、皮膚、各臓器及び坐骨神経周囲組織で大小不同のリンパ球様細胞の浸潤が認められ、脾臓では、白脾髄の動脈周囲リンパ球鞘のT細胞領域で腫瘍細胞の増殖が見られたため、肉眼所見と併せMDと診断した(図9～図13)。





補足的に行ったPCR検査については、非特異的な増幅やスミアの発生がみられ、meq遺伝子の検出には至らなかった（図14）。



まとめ

令和4年2月上旬、管理者により皮膚炎として全部廃棄されたA農場由来のとたいについて、検査員がMDを疑い、検体を持ち帰り精密検査を実施したところ、病理組織学的にMDと診断されたため、直ちに検査員間で情報を共有するとともに、X処理場に対してフィードバックを実施した。

処理場は管理者への教育と農場への情報提供を行い、同様の肉眼所見を呈するものについては、炎症ではなくMDとして全部廃棄することを周知した（図15）。



MDが発生したA農場のMDワクチンの接種状況について、処理場を通じて実情を聴取したところ、卵内接種ではなく皮下接種を施した雛を種鶏場から入雛していたことが分かった。また、同じ時期にA農場と同一の種鶏場からの入雛があったB農場とC農場でもMDの発生が確認された。

検査所がフィードバックを行ったことにより、当該種鶏場はワクチン株の変更を、また、MDの発生が確認された3農場では当該種鶏場からの入雛を見合わせるなどの対策が講じられたため、令和4年5月以降はX処理場でのMDの散発的発生はみられていない（図16）。



近年あまり発生をみない MD であるが、一部の農場などでは散発的に発生し、食鳥処理場に持ち込まれる可能性があることが分かった。

今回の事例のように、適切な診断に基づき農場へ情報提供を行うことは、農場の損失を軽減させると同時に安全な食肉の供給に寄与するものと思われる。今後、MD の肉眼所見の特徴について、県内食肉衛生検査所で情報を共有し、MD が疑われた際の採材や検査方法を確立できればと考えている。

参考文献

食肉衛生検査所業務概要 鹿児島県保健福祉部生活衛生課(平成5年度～令和3年度)

監視伝染病発生年報(農林水産省)

Kyung-Soo CHANG, et al. 2002. The Detection of the meq Gene in Chicken Infected with Marek's Disease Virus Serotype 1. *J.Vet.Med.Sci* 64 (5):413-417

Sung-Il LEE, et al. 2000. Difference in the meq Gene between Oncogenic and Attenuated Strains of Marek's Disease Virus Serotype 1. *J.Vet.Med.Sci* 62 (3):287-292

腹腔内播種性転移を伴う牛の骨外性骨肉腫の一例

是枝七奈 猪俣生輝 岩下幸二

知覧食肉衛生検査所

はじめに

牛の腹腔内に発生し、播種性転移を伴う腫瘍としては、中皮腫、線維肉腫、卵巣の顆粒膜細胞腫などが知られている。管内と畜場に搬入され、解体後検査で腹腔内に播種性に腫瘤形成を認め、組織学的検索により牛では発生が極めてまれな骨外性骨肉腫と診断した症例に遭遇したので、その概要を報告する。

材料及び方法

症例は令和4年2月、管内と畜場に通常畜として搬入された黒毛和種、雌、196ヶ月齢の牛1頭である。生体検査で異常はみられず、解体後検査で腹腔内臓器漿膜面および横隔膜、大網、腸間膜に米粒大から鶏卵大の腫瘤を多数認めた。腎臓周囲では腎臓を包み込むように小児頭大の最大腫瘤を形成していた。これら病変部及び心臓、肝臓、腎臓、脾臓を採取し、細胞診のためスタンプ標本作製し、ディフクイック染色を行った。さらに採取した検体を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法に従いパラフィン包埋切片を作製しHE染色を行った。また、特殊染色としてマッソントリクローム染色、PAS染色、アルシアンブルー染色を行った。硬化した腫瘤はK-CX(ファルマ)を用いて脱灰後、パラフィン包埋切片を作製し同様の染色を行った。

結果

① 肉眼所見

大網及び腹膜、腹腔内の臓器漿膜面、横隔膜臓器側面、腸間膜に播種性に大小の腫瘤を認めた(図1)。腫瘤は乳白色ないし薄桃色を呈し、漿膜から有茎性に隆起するように形成され、小さいものでも検査刀で切開することが困難なほど著しく硬く充実性であった。腎臓周囲では、いくつかの硬い小結節が融合するかのよう小児頭大の最大腫瘤を形成していた(図2)。腹腔および骨盤腔内に限局して存在し、胸骨、脊椎、肋骨、骨盤などの骨組織との関連は認められなかった。



図1

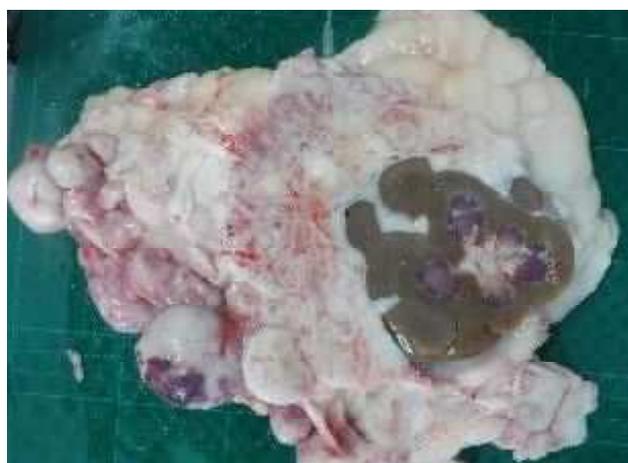


図2

② 細胞診所見

大網腫瘤のスタンプ標本では淡紅色に染まる細胞外基質を背景に、大小不同の腫瘍細胞を多数認めた(図3)。同細胞は大小不同で、広い細胞質に類円形や楕円形の核を持ち、核小体明瞭なものもみられた(図4)。腎臓、肝臓、二胃漿膜面、横隔

膜、腸間膜の腫瘍スタンプ標本でも同様の腫瘍細胞と細胞外基質が確認された。

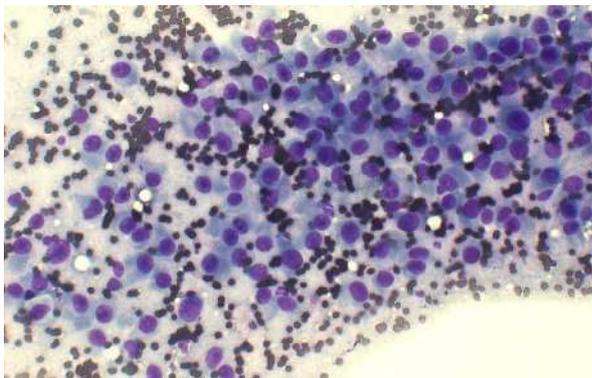


図 3

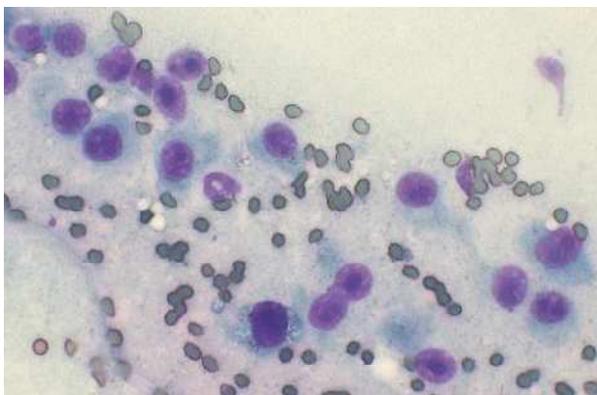


図 4

③ 組織所見

腫瘍は中心部と辺縁部でやや異なる組織像がみられた(図5)。腫瘍中心部では骨芽細胞様の腫瘍細胞と類骨により骨梁が形成されていた。腫瘍細胞は大小不同で三角形ないし多角形の細胞質と濃染する核を持ち、細胞間は疎で網工状となり、類骨を縁取るように一列に並ぶ像もみられた(図6)。腫瘍辺縁部では腫瘍細胞が増加し、類骨形成のほか微小血管やコラーゲンの増生もみられた。同部の腫瘍細胞は広い細胞質に類円形や楕円形の核を持ち、核小体明瞭なものも多く、核分裂像も認められた(図7)。腎臓、脾臓、肝臓、二胃、横隔膜、腸間膜などの腫瘍部は全て同様の所見を示した。加えて、二胃漿膜面に形成された腫瘍では腫瘍細胞の一部が漿膜を超えて筋層に浸潤する部も認められた。特殊染色の結果では、類骨や腫瘍

細胞周囲にコラーゲンやムコ多糖などの骨基質の存在が示唆された(図8)。これら特徴的な組織像より、本症例を骨外性骨肉腫と診断した。

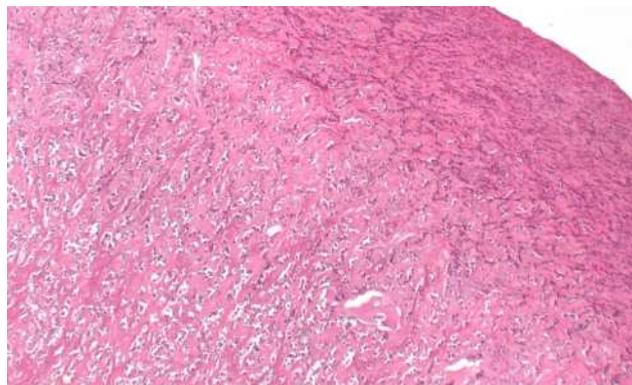


図 5

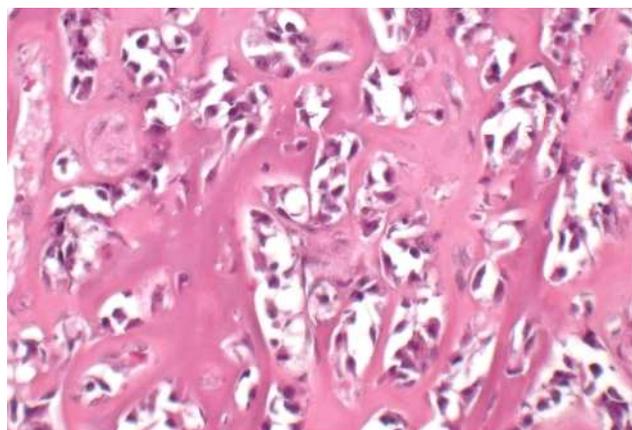


図 6

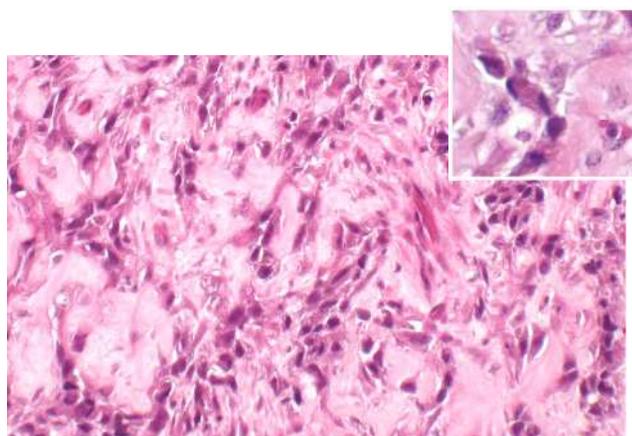


図 7

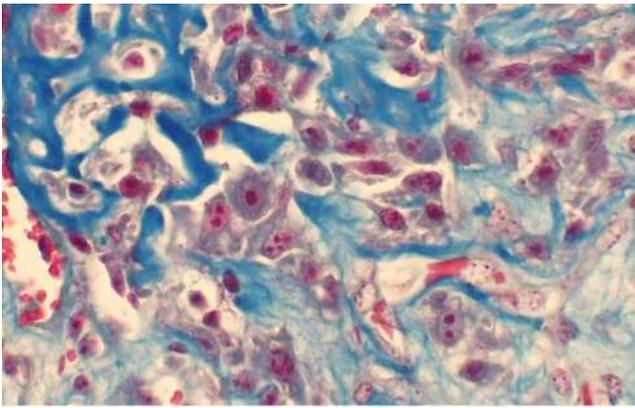


図 8

考 察

骨外性骨肉腫は骨組織以外の組織から発生する稀な腫瘍であり、ヒトや犬などでの発生の報告はあるものの [1] [2]、牛での発生の報告はわずかである [3]。ヒトや犬では、後腹膜原発の肉腫として骨外性骨肉腫の他、脂肪肉腫や線維肉腫などの腫瘍が知られている。今回の牛の症例は、肉眼のおよび組織学的所見がこれらの腫瘍とは異なり、また最大径腫瘤が腎臓周囲に形成されており、同部は腎臓実質や骨盤組織との連続性は認められないことから、後腹膜原発の骨外性骨肉腫が腹膜播種をきたしたものと推察された。

参 考 文 献

- (1) 杉野圭三ら：日臨外会誌、60(3)、831-835 (1999)
- (2) 望月俊輔、前田浩人、砂川知宏、谷川滋子：日獣会誌、62、724-727(2009)
- (3) 須藤亜寿佳、岩田竜治、君付和範：日獣会誌、67、665-669(2014)

ヒトの二相型中皮腫に類似するウシの中皮腫の1症例

丸山覚詞 田中省吾¹⁾ 藤元英樹

志布志食肉衛生検査所, 1) 農研機構動物衛生研究部門鹿児島研究拠点

はじめに

中皮腫は胸膜, 心嚢, 腹膜等の体腔漿膜面を被覆する中皮細胞から発生する比較的稀な腫瘍であり, 体腔内においてびまん性又は播種性の増殖を示し, 組織学的に上皮型, 肉腫型及び二相型(混合型)の3型に大別される。動物ではウシとイヌに多く発生し, と畜検査においては, 全部廃棄となる全身性腫瘍(中皮腫)と部分廃棄となる非腫瘍性病変(反応性中皮)の鑑別が重要である。当所管轄のと畜場では, 令和2年6月から令和3年12月にかけてウシの中皮腫が7例確認されているが, うち1例においてヒトの二相型中皮腫に類似する多彩な形態の腫瘍細胞の特徴的な増殖が認められたので, その概要を報告する。

材料及び方法

症例は通常搬入されたウシ(黒毛和種, メス, 135か月齢)で, 生体検査で異常は認められなかった。解体後検査で胸腹壁及び臓器漿膜面に粟粒大から小豆大の白色乳頭状腫瘍の多発が認められ, 多量の腹水貯留がみられた。

各病変部を採材して材料とし, スタンプ標本を作製しDiff-Quik染色にて細胞診を行った。また, 材料を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後, 常法によりパラフィン包埋切片を作製し, HE染色, PAS反応/アルシアンブルー(以下, PAS/AB)重染色, ジアスターゼ消化試験を併用したPAS反応(以下, ジアスターゼ消化法), ヒアルロニダーゼ消化試験を併用したアルシアンブルー染色(以下, ヒアルロニダーゼ消化法), pH2.5トルイジンブルー染色を施した。さらに, 表1の抗血清を用いて, 以下1~4の手順で免疫組織化学的検討(以下, IHC)を実施した。

1. ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラ後, 3% H_2O_2 メタノールで室温20分処理し, TBST緩衝液で洗浄後, 0.1%アクチナーゼ液に浸漬して37°C15分間処理する(抗原賦活化: アクチナーゼ法)。または, シュウ酸緩衝液(pH6.0)に浸漬後, オートクレーブで121°C5分間熱処理する(抗原賦活化: オートクレーブ法)。
2. 正常血清で処理し(室温30分), 表1の抗血清に反応させた(4°C overnight)。

表1: 使用した抗血清(一次抗体)

抗体名	メーカー	Clone	抗原賦活化	希釈倍率
Glut-1	LSBio	PolyAb	オートクレーブ法	x750
Calretinin	LSP	PolyAb	オートクレーブ法	x20
EMA	LSP	PolyAb	アクチナーゼ法	x600
CD146	LSBio	PolyAb	オートクレーブ法	x600
Desmin	ScyTec	D33	オートクレーブ法	希釈済
S100	Dako	PolyAb	オートクレーブ法	x400
α -SMA	Dako	1A4	アクチナーゼ法	x50
Cytokeratin	Dako	PolyAb	アクチナーゼ法	x500
Vimentin	ARP	VIM3B4	オートクレーブ法	x300

3. 二次抗体にヒストファイブSAB-POキット(ニチレイ)を使用し, 製品説明書に従い反応させた。
4. DAB-クエン酸緩衝液(増感法)で発色後(室温3分), ヘマトキシリンで核染色を実施し(室温2分), 流水洗・脱水・透徹・封入した。

結果

1. 肉眼所見

胸腹膜に粟粒大から小豆大の白色乳頭状腫瘍が多発し, 肺, 肝臓, 脾臓, 第一胃, 小腸, 大腸, 子宮, 横隔膜の漿膜面及び大網にも同様の腫瘍が多数認められた(図1)。腫瘍の断面はやや光沢を有し乳白色充実性であった。また, 腫瘍は炎症性変化を伴い, 漿膜面に局限する充出血, 線維素析出及び偽膜状の炎症産物が認められ, 特に脾臓, 横隔膜において顕著であった。なお, 腫瘍の臓器実質及び枝肉への浸潤所見は

認められず、明らかな原発巣もみられなかった。



図1：体腔内腫瘍の肉眼像

2. スタンプ所見

標本上には核中心性を示す多数の紡錘形細胞が認められた（図2）。紡錘形細胞の核異型及び大小不同は軽度であり、多くは互いに疎に脱落するが、一部は上皮様に密集し集塊状に脱落していた。さらに、鏡面核配列を示す2核細胞が高頻度に出現し、わずかに印環細胞様変化を示す細胞も認められた。

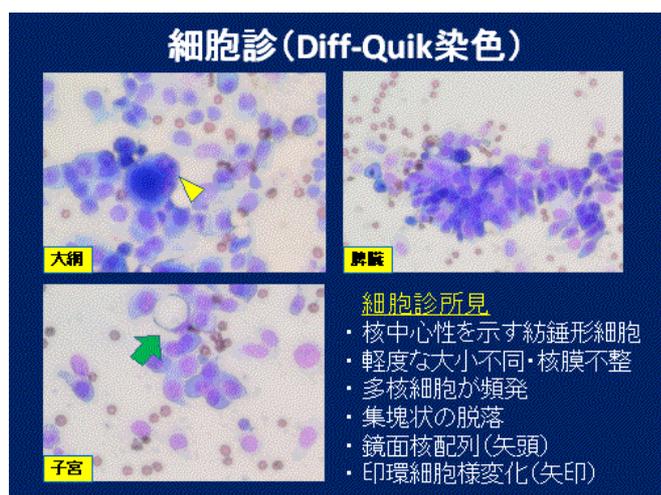


図2：スタンプ像（Diff-Quik染色）

3. 組織所見

腫瘍は各臓器漿膜面から血管新生及び結合織増生を伴い外方性に増殖し、乳頭状増生部を被覆するように増殖する上皮性成分と中皮下組織

に主座する肉腫成分が混在して認められた。上皮性成分では核小体明瞭な類円形核と扁平から円柱状の好酸性の細胞質を有する腫瘍細胞の乳頭状増殖から管状、塊状の増殖が認められ、これらの一部は中皮下組織へと侵襲し、5核以上の多核細胞が散見された（図3）。

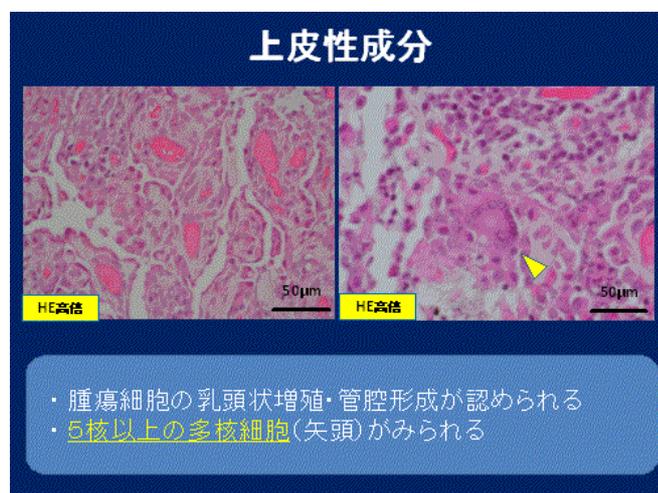


図3：上皮性成分（扁平・円柱状腫瘍細胞）（大網）

肉腫成分では中皮下組織における紡錘形から塊状の腫瘍細胞の不規則な増殖が認められ、アルシアンブルー（以下、AB）陽性からPAS/AB両染性の粘液産生が認められた（図4）。AB陽性粘液はヒアルロナーゼ消化法にて染色性の減弱が認められ、pH2.5トルイジンブルー染色にて陰性を示したことから、ヒアルロン酸の存在が示唆された（図5）。

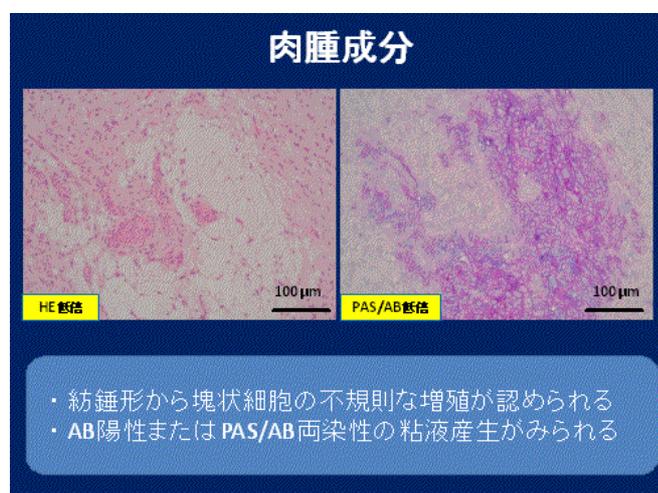


図4：肉腫成分（紡錘形・塊状腫瘍細胞）の増殖及び粘液産生（大網）

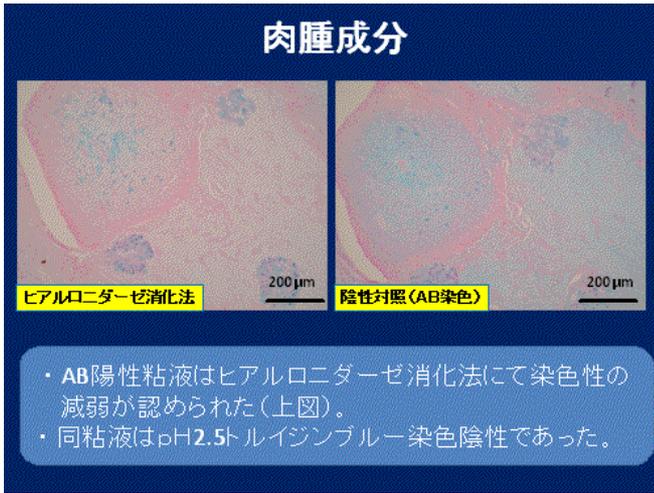


図 5 : AB陽性粘液に対するヒアルロニダーゼ消化法の結果 (脾臓)

また、上皮成分及び肉腫成分と混在して細胞質内に顆粒を充満し印環状を呈する細胞（以下、印環細胞）が認められた（図 6）。これらの印環細胞の顆粒はPAS/AB両染色性であり、ジアスターゼ消化法及びヒアルロニダーゼ消化法にて両酵素への抵抗性が認められ、pH2.5トルイジンブルー染色にてメタクロマジーが認められた（図 7）。以上より、印環細胞の顆粒内における上皮系粘液（中性ムチン・シアロムチン等）の存在が示唆された。

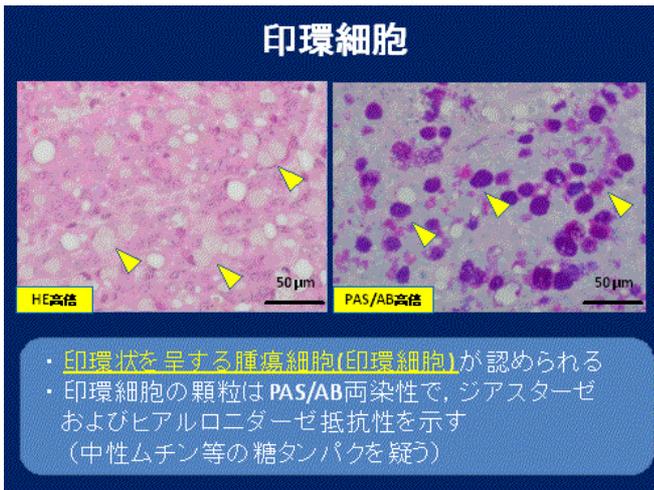


図 6 : 印環細胞のPAS/AB染色性 (脾臓)

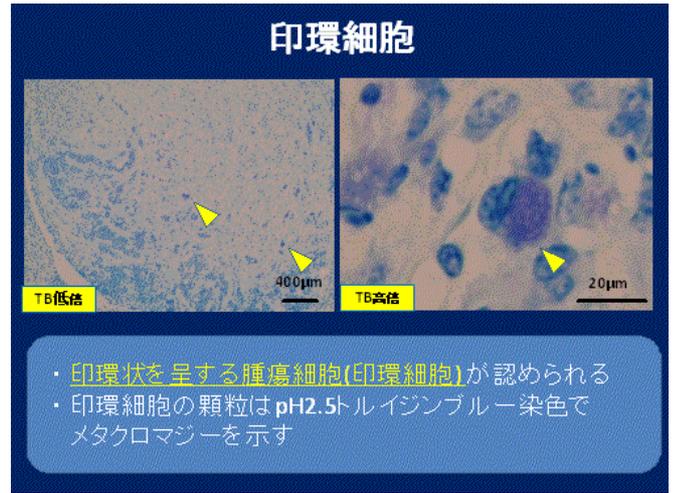


図 7 : 印環細胞のpH2.5トルイジンブルー染色性 (脾臓)

IHCにおいて、腫瘍細胞はCytokeratin, Vimentin, Glut-1, EMA, Calretinin, Mesothelinに陽性を示し（図 8-10）、Desmin, α -SMA, S-100, CD146に陰性を示した（図11）。

なお、腫瘍細胞の1次抗体に対する反応はその細胞形態によって様々であった。以下、その詳細を表 2 に示す。

表 2 : IHC結果

抗体	細胞			中皮下組織		
	扁平中皮	立方・円柱状中皮	多核中皮	印環細胞(粘液産生細胞)	塊状細胞	紡錘形細胞
Cytokeratin	+	+	+	+	+	+
Vimentin	+~-	+~-	+	+	+	+
Glut-1	+	+	+	+	+	+
EMA	+	+	+	+~-	+	+
Calretinin	+	+	+	+~-	+~-	+~-
Mesothelin	+	+	+~-	+~-	+~-	+~-
Desmin	-	-	-	-	-	+
α -SMA	-	-	-	-	-	+
S-100	-	-	-	-	-	+
CD146	-	-	-	-	-	-

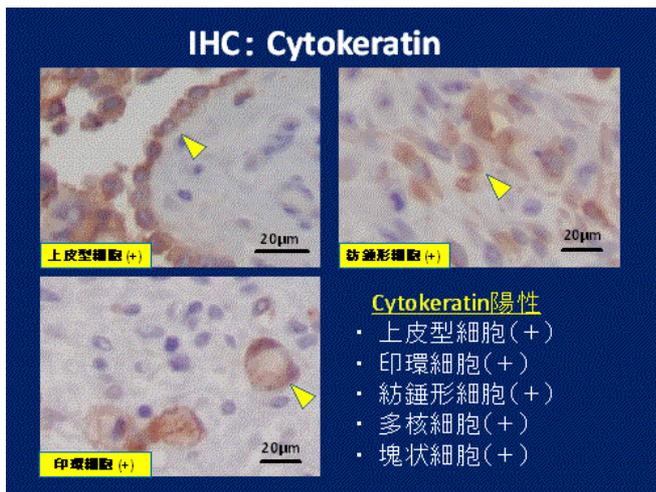


図8 : Cytokeratinに対する反応 (第一胃)

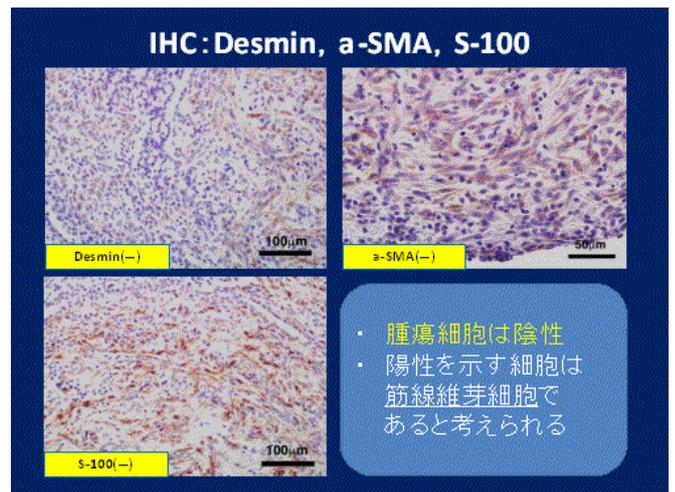


図11 : Desmin, α-SMA, S-100に対する反応 (第一胃)

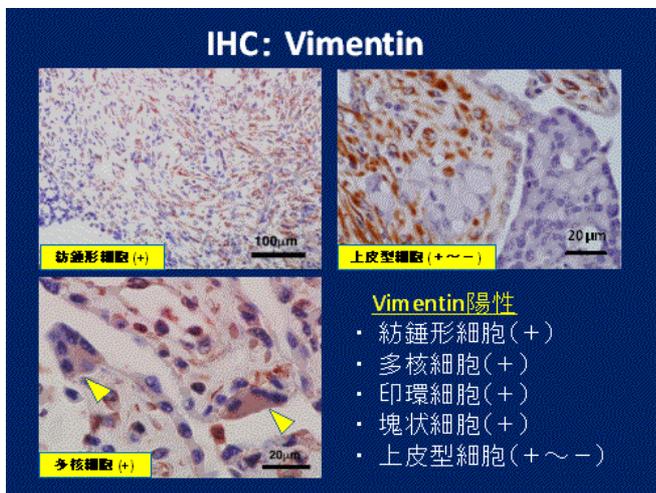


図9 : Vimentinに対する反応 (第一胃)

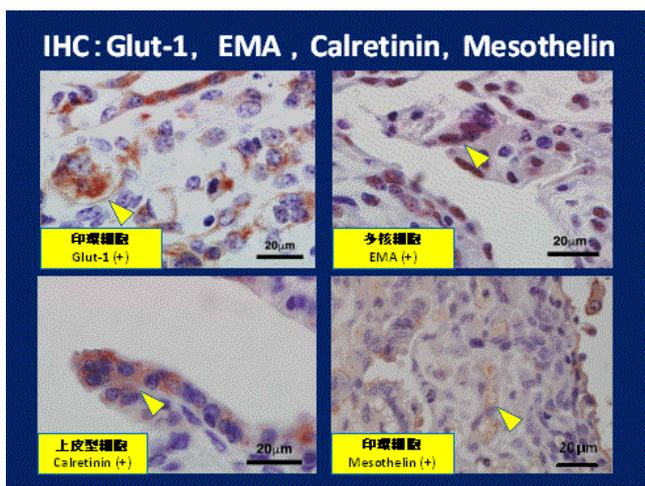


図10 : Glut-1, EMA, Calretinin, Mesothelin に対する反応 (第一胃)

考察

以上の結果を総合して、当症例をヒトの二相型中皮腫に類似するウシの中皮腫と診断した。単に「ウシの二相型中皮腫」としなかった理由は、2015WHO分類において動物の中皮腫の診断名は「中皮腫」のみとなっており、組織型による詳細な分類には至っていないためである。中皮腫の診断においては、非腫瘍性病変（反応性中皮）及びその他の体腔内播種性腫瘍との類症鑑別が重要であるが、鑑別上参考とした所見を以下1, 2に示した。

1. 反応性中皮との鑑別

- 特徴的な二相型の増殖を示す腫瘍細胞が、大網等の脂肪組織へと浸潤する。
- 5核以上の多核細胞が出現する。
- 腫瘍細胞はEMA陽性かつDesmin陰性を示す。

2. 他の体腔内播種性腫瘍との鑑別

- 肉眼的に明らかな原発巣を認めない。
- 複数の中皮腫に特徴的なスタンプ所見。
- 特徴的な二相型の増殖を示す。
- ヒアルロン酸産生能が示唆される。
- IHCに用いた10種の一次抗体のうち9種において中皮腫に典型的な反応を示す。

上記1に関して、中皮腫（特に上皮型）は腫瘍を構成する基本的な構造が正常な中皮と類似しているため、炎症による反応性過形成（反応性中皮）と中皮腫を組織学的に鑑別することが困難な場合があり、また獣医分野では鑑別に用いるIHCの抗体は十分に検討されていない¹⁾。ゆえに鑑別に苦慮するケースが多いが、当症例では、組織学的に二相型の増殖が認められ、軟部組織（大網等）への浸潤性が認められたことから、中皮腫の可能性が高いと考えられた。一方、ヒト分野においては、反応性中皮では5核以上の細胞は殆ど認められないとされ²⁾、またEMA陽性でDesmin陰性の症例は中皮腫の98%、反応性中皮の2%にみられ、逆にEMA陰性でDesmin陽性の症例は反応性中皮の86%、中皮腫にはみられなかったとの報告がある³⁾。これらは当症例の性状と一致しており、診断上の参考となると思われた。

上記2に関して、牛の腹腔内播種性腫瘍には悪性顆粒膜細胞腫や他臓器原発の腺癌などが知られており、中皮腫との鑑別が必要であるが、当症例では組織学的に二相型の増殖が認められ、IHCにてほぼ全ての形態の腫瘍細胞がCytokeratin及びVimentinに共陽性であったことから、中皮腫と診断した。さらに、腫瘍細胞はIHCに用いた5種の中皮腫マーカー（Glut-1, EMA, Calretinin, Mesothelin, CD146）のうち、CD146を除く4種において陽性を示した。その一方で、非中皮腫マーカー3種（Desmin, α -SMA, S-100）において一部の紡錘形細胞が陽性を示した。この細胞は間質成分の筋線維芽細胞である可能性があり、議論の余地は残るが腫瘍細胞は陰性と判断した。

以上を総合的に勘案し前述の診断に至ったが、当症例ではPAS/AB陽性物質を充満する印環細胞形態を示す腫瘍細胞の出現（図6）が特徴的であった。この細胞は通常、印環細胞癌等の腺癌において認められ、ヒトや毒性試験に供試したラットの

中皮腫では報告があるものの⁴⁾⁵⁾、ウシにおいては既報がないものと思われた。また、中皮腫で最も普通にみられる組織型は上皮型であることから⁶⁾、当症例は学術的に貴重な症例と考えられる。以上をもって報告を終えるが、今後も検査業務の一環として組織検索を積極的に実施し、新たな知見の蓄積に繋げていく所存である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多大なる御助言、御指導を頂いた農研機構動物衛生研究部門鹿児島研究拠点の田中省吾先生に心から感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) John S. Munday, Christiane V. Löhr, and Matti Kiupel. Tumors of the Alimentary Tract. Donald J. Meuten: TUMORS in Domestic Animals 5th Edition. 2017;592-595
- 2) 日本肺癌学会 編. 悪性胸膜中皮腫細胞診断の手引き（第1.0版2017年11月）p4
- 3) Hasteh F, Lin GY, Weidner N, et al.: The use of immunohistochemistry to distinguish reactive mesothelial cells from malignant mesothelioma in cytologic effusions. Cancer Cytopathol 118:90-96, 2010
- 4) Nelson G Ordóñez: Mesothelioma with signet-ring cell features: report of 23 cases. Modern Pathology 26, 370-384, 2013
- 5) Tanaka N, Izawa T, Yamate J, and Kuwamura M. Spontaneous nephroblastoma with striated muscle differentiation in an F344 rat. J Toxicol Pathol. 30: 231-234. 2017
- 6) 日本獣医病理学専門家協会 編 動物病理カラーアトラス. (初版 2007年2月) p105

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 mycoides</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）－フィードバック事業の1つの成果－ ・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）－フィードバック事業の一例－ ・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性筋炎の一症例 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ブ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 鹿屋食肉衛生検査所	<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 ・と畜検査において、豚骨髓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

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
平成28	知覧食肉衛生検査所	・と畜場における牛枝肉の衛生対策
	串木野食肉衛生検査所	・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
	阿久根食肉衛生検査所	・ <i>Mycoplasma bovis</i> が関与した牛の心内膜炎
	大口食肉衛生検査所	・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
	末吉食肉衛生検査所	・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
	志布志食肉衛生検査所	・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
	鹿屋食肉衛生検査所	・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	・生食用食鳥肉加工工程における細菌汚染実態調査
	串木野食肉衛生検査所	・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」～
	阿久根食肉衛生検査所	・豚赤痢の分離培地及び検査法の検討
	大口食肉衛生検査所	・黒毛和種における <i>Mycoplasma bovis</i> の浸潤状況
	末吉食肉衛生検査所	・ヨーネ病対応マニュアルの作成
	志布志食肉衛生検査所	・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
	鹿屋食肉衛生検査所	・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
平成30	知覧食肉衛生検査所	・鶏肝臓におけるカンピロバクター汚染状況調査
	串木野食肉衛生検査所	・牛の腹腔内腫瘍にみられた内分泌系腫瘍の1例
	阿久根食肉衛生検査所	・大規模食鳥処理場における衛生指導及び細菌汚染低減への取り組み
	大口食肉衛生検査所	・豚の心臓腫瘍の1例と疣贅性心内膜炎の比較
	末吉食肉衛生検査所	・豚の疣贅性心内膜炎由来 <i>Streptococcus suis</i> の疾病リスクと薬剤耐性状況調査 ・酸性電解水及び過酢酸製剤処理による微生物汚染低減効果の検証 ～平成29年度厚生労働省「食鳥肉における微生物汚染低減策の有効性実証事業」実績報告～
	志布志食肉衛生検査所	・管轄食鳥処理場等への外国政府調査の概要 ・農場へい死鶏及び食鳥検査廃棄鶏における鶏病原性大腸菌の遺伝子学的比較
	鹿屋食肉衛生検査所	・輸出認定施設におけるATP拭き取り検査を活用した衛生指導 ・ <i>Lawsonia intracellularis</i> によると考えられる豚の小腸炎に関する調査 ・と畜検査データの双方向性フィードバックの一例

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
令和元	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"> ・食肉加工施設における食鳥肉の表面加熱の効果の検証 ・と畜データを活用した地方病性牛白血病(EBL)の発生状況の調査 ・鶏病原性大腸菌の鶏の増体への関連因子 ・黒毛和種肥育牛における血液性状と枝肉成績との関連 ・<i>Mycoplasma</i>の関与した心内膜炎および腹大動脈塞栓を認めた牛の症例 ・食鳥処理場のカンピロバクター汚染度把握と低減への取り組み ・食鳥処理場で検出された<i>Campylobacter jejuni</i>におけるギランバレー症候群(GBS)関連遺伝子の保有調査 ・鶏病原性大腸菌の鶏の増体への関連因子 ・地方病性牛白血病の迅速診断の試み ・フィードバック対象農場における肺炎由来菌の薬剤感受性試験
令和2	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"> ・試行した切除法による細菌検査の結果と課題 ・ブロイラーの浅胸筋変性症の病態調査 ・管内と畜場で分離された豚のサルモネラ属菌の実態調査 ・マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF MS)を用いた敗血症分離菌の同定 ・黄疸の指標としての肝臓中パルミチン酸レチノール ・枝肉重量と内臓病変及び枝肉重量遺伝子<i>CW-2</i>との関連性 ・<i>Streptococcus</i>属菌のMultiplexPCRによる菌種同定の検討 ・<i>Streptococcus suis</i>が高率に発生した農場における薬剤耐性状況 ・令和元年度の保留豚における抗菌性物質残留陽性事例の調査
令和3	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"> ・管内と畜場で分離された牛肺炎由来菌の薬剤感受性 ・豚カット処理施設における低温細菌の分離と発育温度の検討 ・鶏の肝臓における食中毒菌等の汚染状況調査 ・と畜検査でみられたパスツレラ科細菌による全身性感染症 ・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた豚肉中のβアゴニスト系薬剤定量法の検討 ・牛肉表面のSTEC汚染に対する薬剤による消毒効果の検討 ・牛の横隔膜胸腔面にみられたB細胞性リンパ腫の1症例 ・管内と畜場に搬入された<i>Escherichia albertii</i>保菌状況調査

年度	検査所名	発表内容及び研究内容
令和4	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"> ・管内と畜場で確認された気腫疽と悪性水腫の症例 ・腹腔内播種性転移を伴う牛の骨外性骨肉腫の一例 ・と畜場における豚副生物の細菌汚染実態調査 ・鶏における <i>Clostridioides difficile</i> の保菌状況調査 ・と畜場出荷豚におけるPRDC関連病原微生物の検出と分子系統樹解析 ・と畜検査でみられた <i>Mycoplasma suis</i> による豚へモプラズマ病 ・牛の呼吸器疾患と枝肉重量 ・管内食鳥処理場で確認されたマレック病と発生農場へのフィードバック事例 ・ヒトの二相型中皮腫に類似するウシの中皮腫の1症例 ・精密検査における <i>Streptococcus suis</i> の同定方法の検討