

第 4 章

研 修

及 び

調 査 研 究

1 技術研修

研修会等の名称	場所	派遣人数	期間
全国食肉衛生検査所協議会 病理部会	神奈川県	1名	平成28年5月19～20日
食鳥処理場 HACCP 勉強会	井原市	1名	平成28年5月12日
平成28年度食肉衛生検査研修	埼玉県	1名	平成28年6月6日～7月1日
全国食肉衛生検査所所長会議	仙台市	1名	平成28年7月20～21日
岡山県・岡山市・倉敷市 食品衛生監視員研修会	岡山市	3名	平成28年7月29日
岡山県獣医公衆衛生学会	岡山市	3名	平成28年8月5日
中国地区 食品衛生監視員研究発表会	福山市	1名	平成28年8月25日
全国食肉衛生検査所協議会 理化部会	茨城県	1名	平成28年10月7日
日本獣医公衆衛生学会（中国）	広島市	3名	平成28年10月22～23日
全国食肉衛生検査所協議会中四 国ブロック会議及び技術研修会	愛媛県	2名	平成28年10月27～28日
全国食肉衛生検査所協議会 微生物部会総会・研修会	横浜市	1名	平成28年11月8～9日
全国食肉衛生検査所協議会 病理部会	神奈川県	1名	平成28年11月16～17日
中国ブロック獣医師会公衆衛生 講習会	岡山市	6名	平成28年12月9日
野生獣からの疾病感染防止対策 研修会	岡山市	1名	平成28年12月12日
食肉衛生技術研修会 衛生発表会	東京都	1名	平成29年1月23～24日
食鳥肉衛生技術研修会 衛生発表会	東京都	1名	平成29年1月25～26日
岡山県・岡山市・倉敷市 食品衛生監視員研修会	岡山市	1名	平成29年1月27日
食鳥検査員全体会議	岡山市	1名	平成29年3月12日

2 講演及び研究発表

年 月 日	学会等の名称	題 名	発 表 者
平成 28 年 8 月 25	中 国 地 区 食 品 衛 生 監 視 員 研 究 発 表 会	合ガモ処理施設における衛生指導について	村 上 泰 之
平成 28 年 10 月 22～23 日	中 国 地 区 日 本 獣 医 公 衆 衛 生 学 会	岡山県内で流行している牛白血病ウイルスの分子疫学的解析	葛 谷 光 隆
		Ｔと畜場に搬入された牛における住肉胞子虫(Sarcocystis)の感染実態調査	逢 坂 裕 貴
平成 28 年 11 月 8～9 日	全国食肉衛生検査所協議会 微 生 物 部 会 研 修 会	原因菌の同定に苦慮した悪性水腫の一例	藤 澤 幸 平
平成 28 年 11 月 16～17 日	全国食肉衛生検査所協議会 病 理 部 会 研 修 会	牛の皮膚	橋 本 英 典

合ガモ処理施設における衛生指導について

村上泰之、葛谷光隆、橋本英典、
藤澤幸平、逢坂裕貴、大津寄洋史

1 はじめに

平成 27 年、県北に合鴨処理専用の認定小規模施設(以下、「A 施設」という。)が新設された。月ごとの処理羽数は約 1 万羽で、合鴨用としては全国的に見ても処理羽数が比較的多い施設である。平成 28 年 2 月、認定小規模食鳥処理施設の通常監視において、食鳥と体等の拭き取りを行ったところ、微生物による汚染が著しかったことから、微生物汚染の低減を図るべく衛生指導を行い、その過程で若干の知見を得たので概要を報告する。

2 材料及び方法

(1) 調査期間：平成 28 年 3 月～7 月

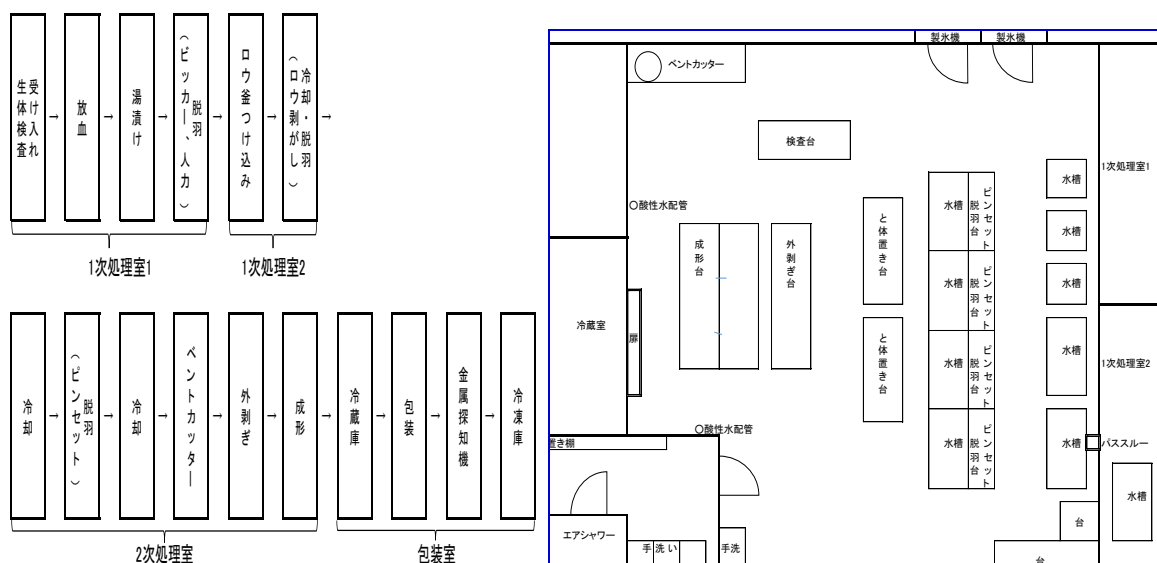
(2) 処理施設の概要

(合鴨)：自社生産

(飼育施設が A 施設に隣接。チェリバリ一種、飼育羽数 13,448 羽(H28, 2/1))

(工程)：外剥ぎ方式(図 1 のとおり。)

2 次処理室には、強酸性水が配管されている(図 2 のとおり。)



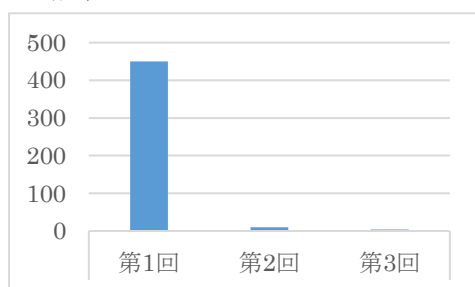
(図 1：工程フロー)

(図 2：2 次処理室)

(3) 検査材料：上記ピンセット脱羽後冷却、外剥ぎ、成形工程の食鳥と体について、拭き取りを各 1 検体(3 羽で 1 検体とした)、同じく外剥ぎ、成形工程のまな板と包丁の拭き取りを各 1 検体、冷蔵庫取っ手の拭き取りを 1 検体とし、拭き取り面積はいずれも 25cm² とした。また、成形工程で用いられている強酸性水を検体とした。

- (4) 検査方法：検査は平成 28 年 3 月から 7 月にかけて計 6 回実施し、一般細菌数、大腸菌群数についてはペトリフィルムを、カンピロバクター属菌についてはミニバイダスを用いた。
- (5) 目標：「食鳥処理場における HACCP 方式による衛生管理指針（厚生省生活衛生局乳肉衛生課編）」を参考に、成形工程で作成した成形肉の表面の一般細菌数のオーダーを 10^3cfu/cm^2 台とすることを目標とした。

3 結果



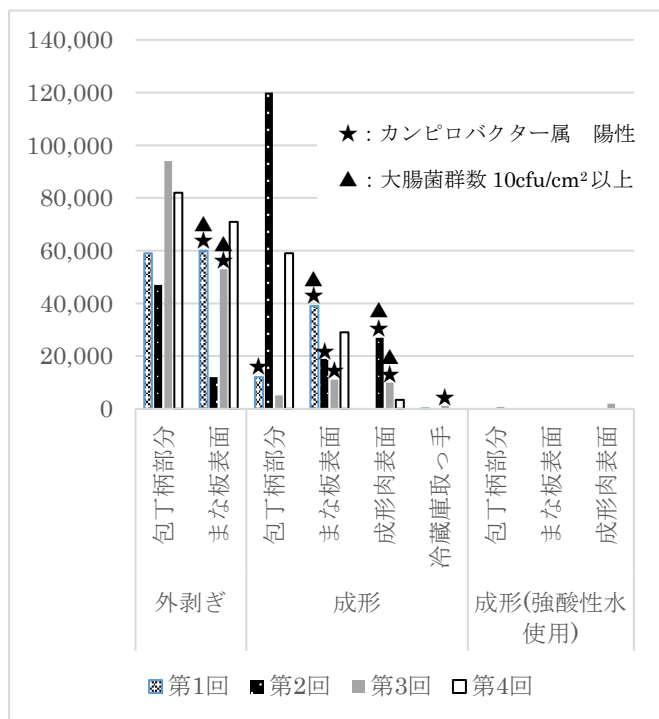
(図 3：冷却後と体表面の細菌数)

保管場所の変更を指導した。その結果、外剥ぎ直前のと体における一般細菌数が改善された (図 3)。

(1) ピンセット脱羽～冷却

1 次処理室 2 でロウ剥がしされたと体は、パススルーを経て 2 次処理室の冷却槽に入る。この冷却槽は温度、残留塩素の設定がなかったため、設定のあるピンセット脱羽後冷却槽と同様の管理に変更した (設定：水温 10°C 以下、残留塩素 80ppm 以上)。また、ピンセット脱羽に用いる器具の取り扱いに不備が見られたため、1 羽毎の洗浄と消毒、

(2) 外剥ぎ工程、成形工程



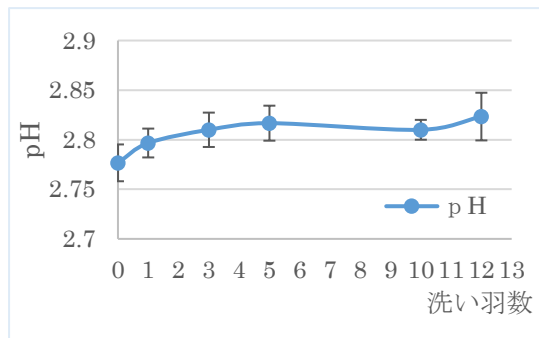
(図 4：拭き取り結果 (一般細菌数、cfu/cm²))

外剥ぎ工程でと体を触るたびに総排泄腔 (クロアカ) と口から汚物が出ており、肉の受け渡しは台を滑らせて行うことから、外剥ぎ作業で生じる肉汁等とともに成形工程を直接汚染していた。そのほか、滑り止めに布巾をまな板に敷くなど、衛生的な取り扱いができていなかった。

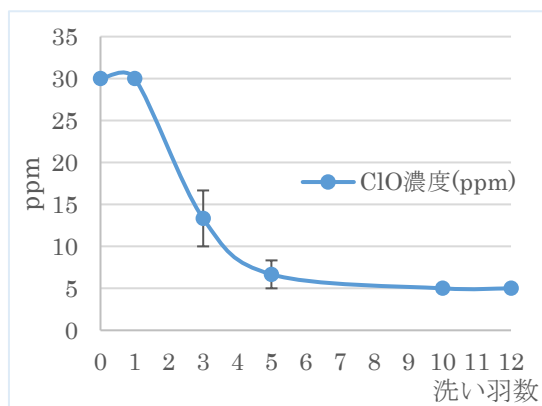
外剥ぎ工程と成形工程を離し、肉の受け渡しにトレーを用い、外剥ぎ肉を強酸性水ですすぐなどの工夫の結果、成形肉表面の一般細菌数は目標に達したが、外剥ぎ及び成形工程の器具による汚染等、課題が残った (図 4)。

(3) 強酸性水の使用条件等の検討

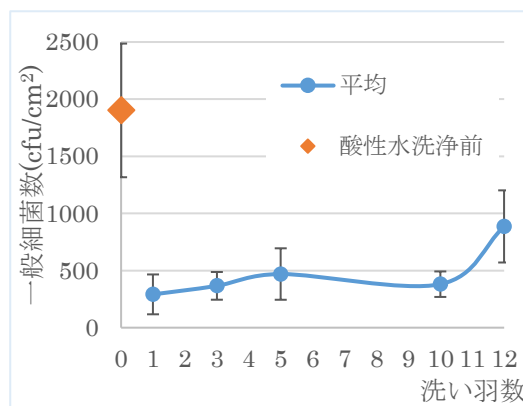
成形工程で外剥ぎ肉の洗浄に用いている強酸性水について調べたところ、pHは洗い羽数に関係なくほぼ一定であること(図5)、残留塩素濃度は、3羽の洗浄で50%、5羽の洗浄では25%まで低下すること(図6)、洗い羽数1羽目と12羽目では、洗浄後の外剥ぎ肉表面の菌数に5倍の差があること(図7)から、強酸性水の効果は急速に劣化することが示唆され、また効果はpHの変化で判断できないことがわかったので、残留塩素の測定で管理し、少ない洗い羽数で交換するか、流しながらすすぐことを指導した。



(図5: 洗い羽数と pH)



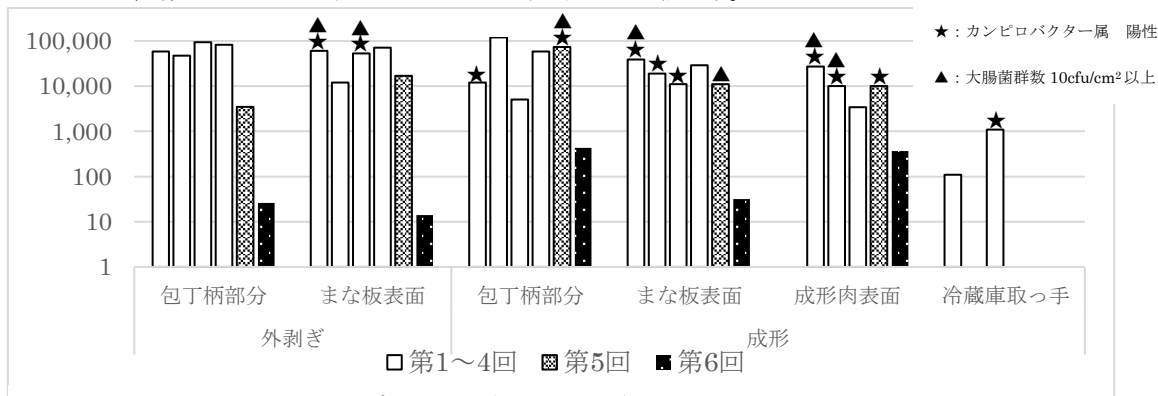
(図6: 洗い羽数と残留塩素濃度)



(図7: 洗い羽数と拭き取り菌数)

(4) 最終的改善内容

以上の指導から、A施設は1羽の処理毎に、強酸性水で器具等の洗浄を徹底し、外剥ぎ肉の洗浄をバケツから掛流し槽へ変更し、新たにクロアカを洗浄吸引する銃型のベントカッターを導入した。それらが奏功し、各拭き取り結果は、一般細菌数 10^2 cfu/cm² 台のレベルまで低下した(図8)。



(図8: 拭き取り結果 (一般細菌数, cfu/cm²))

4 考察

食鳥処理において、外剥ぎ方式は中抜き方式に比べて、腸内容物等が施設を汚染することが少ないので、微生物制御には有利と考えられる。しかし、外剥ぎ作業中に、と体から消化器内容物が漏出しており、清浄区域内に汚染区域が出現することになる。外剥ぎ処理における一般細菌数について、他者報告 [1, 2, 3] においても、成形後の部分肉では一般細菌数が高い傾向にあるが、A 施設の例と同じく、消化器内容物の二次汚染によるものではないかと思われる。A 施設ではクロアカを洗浄吸引するベントカッターを導入し、腸内容物の漏出防止を図ったところ、これが奏功したと考えられた。

A 施設には施設洗浄用の強酸性水生成装置があり、これを外剥ぎ、成形工程に活用することで微生物制御を図ったところ、適切に使用すれば二次汚染の低減に効果的であることがわかった。

今回指導した A 施設は、管内の認定小規模施設の中でも従事者の衛生意識が高く、整理整頓、衛生状態も良好な施設である。今後、A 施設でも HACCP 方式が取り入れられるよう、助言、指導を行っていく予定である。

5 参考文献

- [1] 川上国彦（岡山県食肉衛生検査所）：認定小規模食鳥処理施設における生食用食鳥肉の販売実態及び細菌汚染状況、岡山県食肉衛生検査所平成 22 年度業務概要
- [2] 石川陽子 他：合鴨処理施設における微生物汚染実態調査について、埼玉県食肉衛生検査センター平成 18 年度事業年報
- [3] 徳永貢一郎 他：中抜き及び外剥ぎ処理された食鳥と体の微生物汚染状況と衛生指導について、平成 20 年度全国食肉衛生検査所協議会技術研修会（愛媛県食肉衛生検査センター）

岡山県内で流行している牛白血病ウイルスの分子疫学的解析

葛谷 光隆

1 はじめに

牛白血病 (Bovine leukosis ; 以下 BL) は体表及び体腔内リンパ節の腫大や、各種臓器における腫瘍形成等の異常を示す疾病で、大きく地方病性 (成牛型) と散発型に分類される [1]。地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis) は、牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus ; 以下 BLV) の感染により引き起こされ、近年全国的にその発生が増加傾向にある [1]。牛白血病は家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されていることから、と畜場において本疾病と診断された場合には、と畜場法により全部廃棄処分となるため、畜産農家等にとって経済的損失は大きい。

これまでに、平成 21 年度～平成 26 年度に所管 T と畜場で発見された BL 牛から検出された BLV の遺伝子解析により、岡山県内で 4 つの異なる遺伝子型の BLV が流行していること、また地域や牛の品種により遺伝子型分布に違いがみられることなどを明らかにした [2]。しかしながら、この遺伝子型は、制限酵素切断点という限られた領域の相違に基づく分類であるため、BLV 株の遺伝子系統学的な関係については明らかではない。そこで、県内流行株の遺伝子配列を決定し、比較解析を行った。

2 材料及び方法

平成 21 年度～平成 27 年度に所管と畜場で発見された県外飼育歴のない BL 牛 51 頭から検出された BLV 株を試験に用いた (表)。Fechner ら [3] の報告に基づく PCR 法により、供試株のエンベロープ遺伝子 gp51 領域 (塩基長 400 bp) を増幅後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

得られた配列について、Clustal W (フリーソフト) を用いて遺伝子系統解析を実施した。なお、同様の解析を 1,000 回繰り返した場合に、同一結果が得られる回数 (ブートストラップ値) で系統解析の信頼性を評価した。

また、供試株の制限酵素切断に基づく遺伝子型 (以下 R 型) については、前述の PCR 法により増幅された産物を、3 種類の制限酵素 (*Bcl* I、*Hae* III 及び *Pvu* II) で個別に切断されたパターンに基づき同定した [4]。

3 結果

51 株の塩基配列について、遺伝子系統解析に基づく genotype 型の代表株 [5] を加え近隣結合合法による系統解析を実施したところ、49 株が genotype 1 に、2 株が genotype 3 に分類され、G1 型には 22 のバリエントが、G3 型には 2 つのバリエントが存在することがわかった (表及び図 1)。牛の品種別では、ホルスタイン種からは genotype 1 (15 バリエント) 及び genotype 3 (2 バリエント) が検出されたが、黒毛和種からは genotype 1 (10 バリエント) のみが検出された (図 1)。

一方 R 型については、36 株が R1 型、9 株が R3 型、2 株が R5 型、4 株が R6 型と同定された

表 供試BLV株の由来と遺伝子解析結果

株No.	採取年月日	品 種	月 齢	R型 [※]	genotype	株No.	採取年月日	品 種	月 齢	R型	genotype
OKL9	H21.10.19	黒毛和種	126	1	1	OKL127	H27.5.14	ホルスタイン	68	1	1
OKL15	H22.11.2	ホルスタイン	87	1	1	OKL134	H27.7.6	ホルスタイン	132	1	1
OKL21	H23.4.11	ホルスタイン	65	1	1	OKL135	H27.7.29	ホルスタイン	103	1	1
OKL42	H24.1.25	ホルスタイン	176	1	1	OKL136	H27.10.1	ホルスタイン	59	1	1
OKL46	H24.4.12	黒毛和種	76	1	1	OKL137	H27.10.1	黒毛和種	70	1	1
OKL56	H24.12.10	ホルスタイン	56	1	1	OKL145	H27.12.24	黒毛和種	84	1	1
OKL58	H24.12.26	黒毛和種	66	1	1	OKL146	H28.1.14	黒毛和種	109	1	1
OKL61	H25.3.6	ホルスタイン	48	1	1	OKL149	H28.2.15	ホルスタイン	90	1	1
OKL75	H25.10.28	ホルスタイン	98	1	1	OKL150	H28.2.22	黒毛和種	94	1	1
OKL76	H25.11.6	ホルスタイン	82	1	1	OKL151	H28.3.9	ホルスタイン	64	1	1
OKL78	H25.11.18	ホルスタイン	59	1	1	OKL37	H23.11.14	黒毛和種	74	3	1
OKL80	H25.12.19	黒毛和種	74	1	1	OKL38	H23.12.27	黒毛和種	75	3	1
OKL84	H26.1.15	ホルスタイン	26	1	1	OKL49	H24.5.14	黒毛和種	88	3	1
OKL89	H26.2.17	黒毛和種	69	1	1	OKL57	H24.12.19	黒毛和種	53	3	1
OKL90	H26.3.10	ホルスタイン	63	1	1	OKL107	H26.6.2	ホルスタイン	91	3	1
OKL91	H26.3.12	黒毛和種	134	1	1	OKL113	H26.10.9	ホルスタイン	115	3	1
OKL99	H26.4.2	ホルスタイン	98	1	1	OKL116	H26.12.18	黒毛和種	69	3	1
OKL102	H26.4.15	黒毛和種	150	1	1	OKL122	H27.3.10	黒毛和種	59	3	1
OKL103	H26.4.21	黒毛和種	73	1	1	OKL141	H27.11.18	黒毛和種	89	3	1
OKL104	H26.5.8	黒毛和種	72	1	1	OKL65	H25.4.18	ホルスタイン	110	6	1
OKL106	H26.5.28	交雑種	21	1	1	OKL85	H26.1.7	ホルスタイン	46	6	1
OKL119	H27.2.3	ホルスタイン	108	1	1	OKL126	H27.4.27	黒毛和種	61	6	1
OKL121	H27.3.3	ホルスタイン	75	1	1	OKL140	H27.11.4	ホルスタイン	96	6	1
OKL123	H27.3.18	黒毛和種	99	1	1	OKL43	H24.2.22	ホルスタイン	43	5	3
OKL124	H27.3.23	ホルスタイン	40	1	1	OKL79	H25.11.26	ホルスタイン	76	5	3
OKL125	H27.4.8	ホルスタイン	67	1	1						

※制限酵素切断による遺伝子型

(表)。genotype と R 型との関係では、R1、R3 及び R6 型株が genotype 1 に、R5 型株が genotype 3 に分類されたが、一部の R1 型株 (OKL46、58、80、103、104、121、125、135)、R3 型株 及び R6 型株については、系統樹上でそれぞれ独立したクラスターを形成した (図 1)。

次に、BLV 株の遺伝的関連性と BL 牛飼育農場の地理的關係について検討を行った。まず、R1

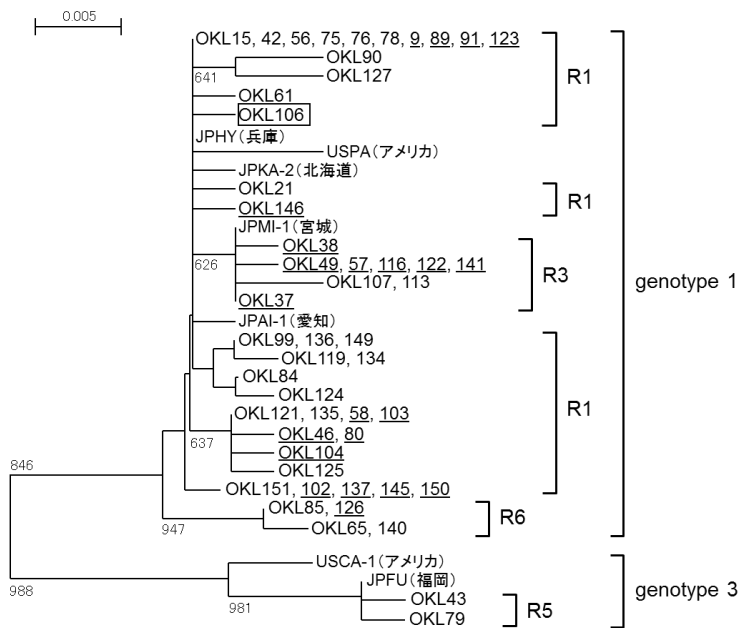


図 1 エンベロープ gp51 領域の遺伝子系統解析結果

標準株の括弧内には、分離国または国内株では分離県を示す。岡山県由来株 (OKL) については、黒毛和種由来株を下線で示し、交雑種由来株を枠で囲った。系統樹上の数値はブートストラップ値 (600 以上表示) を示す。同一配列については、系統樹上の同一位置に株名を列記した。R は制限酵素切断に基づく遺伝子型を示す。

型で同一配列の 10 株が検出された牛の分布をみると (図 2、地図 A)、ホルスタイン種では地理的に近い農場の牛から、黒毛和種では離れた地域の農場の牛から、これらの株が検出されていることがわかった。また、R1 型で独立したクラスターを形成していた 8 株についても同様に調べたところ (図 2、地図 B)、同一配列株の場合と同じ傾向が認められた。さらに、R3 型の 9 株についてみると (図 2、地図 C)、黒毛和種において、離れた農場の牛から、遺伝的に近縁な株が検出されていた。一方、R6 型 4 株が検出された牛の分布か

ら（図 2、地図 D）、これらの株が県内の限られた地域でのみ流行していることがわかった。

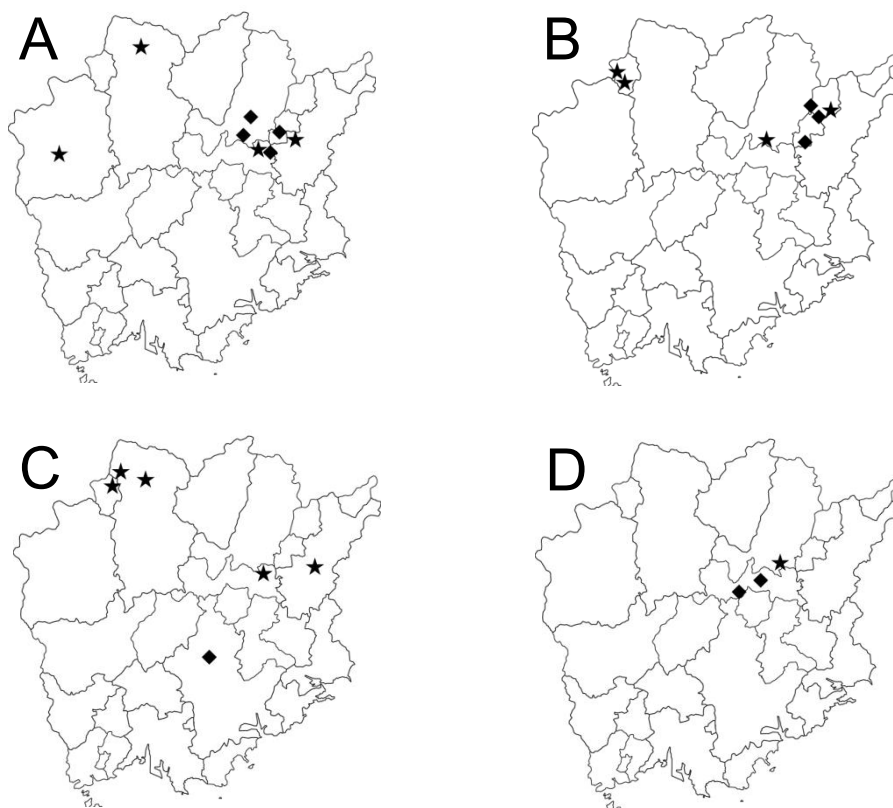


図 2 BLV 感染牛飼育農場の地理的分布

感染牛飼育農場の位置を地図上にプロットした。ホルスタイン飼育農場を◆で、黒毛和種飼育農場を★で示す。なお、同一農場検出例があるため、株数とプロット数は必ずしも一致しない。

地図 A : R1 型の同一配列 10 株 (OKL9、15、42、56、75、76、78、89、91、123) 感染牛の分布

地図 B : R1 型の近縁 8 株 (OKL46、58、80、103、104、121、125、135) 感染牛の分布、

地図 C : R3 型の 9 株 (OKL37、38、49、57、107、113、116、122、141) 感染牛の分布

地図 D : R6 型の 4 株 (OKL65、85、126、140) 感染牛の分布

4 考 察

今回の結果から、県内で流行している BLV には、genotype 1 及び genotype 3 の大きく 2 系統が存在すること、また genotype 1 には、多くのバリエントが存在することなどが明らかになった。Matsumura らは [6]、2008 年～2010 年に全国各地で検出された BLV について遺伝子系統解析を実施し、genotype 1 と genotype 3 の 2 系統が存在すること、genotype 1 が遺伝的多様性に富むことなどを報告しているが、今回の結果は、この調査結果とほぼ一致するものであった。

牛の品種別では、ホルスタイン種からは 2 つの genotype の計 17 バリエントが検出されたのに対し、黒毛和種からは genotype 1 の 10 バリエントのみが検出されるなど、ホルスタイン種において、より遺伝的に多様な BLV が流行していることがわかった。当所で実施した県内産 BL 牛の調査において、ホルスタイン種の約半数に県外飼育歴が確認されたのに対し、黒毛和種では県外飼育歴が全くないことが明らかになった [2]。したがって、ホルスタイン種における流行株の遺伝的多様性は、県外から持ち込まれたウイルスにより生じたものではないかと推察された。

一方、今回の系統解析結果から、ホルスタイン種では、遺伝的に近縁な株が地理的に近い農場の牛から検出されたのに対し、黒毛和種では、このような株が離れた地域の農場の牛からも検出されることがわかった。このことは、黒毛和種では、感染牛（主に子牛など）の移動等に伴ってウイルス株が遠隔地へと運ばれていることを示すものである。したがって、黒毛和種の BL 対策においては、母子感染の防止により重点を置く必要がある。

R6 型 BLV の解析結果から、本型が遺伝的に近縁であり、かつ県内の限られた地域でのみ流行していることがわかった。R6 型株は平成 25 年に県内ではじめて検出されたことから [2]、近年に牛の導入等により本ウイルスが県内に持ち込まれたものの、その流行が限られた地域にとどまっているものと推察された。今後、県内における R6 型 BLV の流行の広がりを監視するためにも、県内産 BL 牛のウイルス保有調査を継続する必要がある。

R 型別は、比較的簡便に実施できることから、多くの都道府県等において本法を用いた BLV 調査が行われている [7~9]。今回の結果より、R 型はウイルス株の遺伝的関係を概ね反映していると考えられることから、R 型別が BLV の遺伝的関連性を簡易的にみるうえで有用であると思われる。ただし、R1 型には遺伝的に多様なウイルスが存在することから、詳細な比較には遺伝子系統解析の併用が望ましい。

5 文 献

- [1] 村上賢二 ほか：我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策 -その現状と課題-、日獣会誌、62、499~502 (2009)
- [2] 葛谷光隆 ほか、岡山県内で流行している牛白血病ウイルスの遺伝子解析、日獣会誌、69、617~621 (2016)
- [3] Fechner H、*et al.* : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle、Virology、237、261~269 (1997)
- [4] Licursi M、*et al.* : Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan、Vet Microbiol、96、17~23 (2003)
- [5] Rola-Luszczak M、*et al.* : The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny、Plos One、8、e58705 (2013)
- [6] Matsumura K、*et al.* : Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leucosis in Japan、Virus Res、155、343~348 (2011)
- [7] Asfaw Y、*et al.* : Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan、Arch Virol、150、493~505 (2005)
- [8] 藤元英樹 ほか：管内と畜場で牛白血病が疑われた症例の検討、平成23年度鹿児島県食肉衛生検査所業務概要、62~65 (2011)
- [9] 須藤亜寿佳 ほか：山形県で流行しているBovine Leukemia Virusの遺伝子型別及び病理学的検索、日獣会誌、65、883~887 (2012)

Tと畜場に搬入された牛における住肉胞子虫 (*Sarcocystis*) の感染実態調査

○逢坂裕貴 橋本英典

1. はじめに

住肉胞子虫（以下、「*Sarcocystis*」とする。）は、感染する動物種が広く、近年、馬肉の生食において食中毒事例が発生する等、公衆衛生上重要な原虫として知られている。牛における本原虫の汚染状況については、おもに東日本～中部地方で調べられているが、西日本、特に中四国地方の牛における感染実態は明らかではない。また、牛の心筋での *S. cruzi* の感染率が高いという報告もある〔1、2〕。そこで、管内と畜場に搬入された牛について調査を実施したので報告する。

2. 材料及び方法

平成 28 年 1 月～4 月に T と畜場に搬入された県内産牛 60 頭(ホルスタイン種 47 頭、ジャージー種 13 頭)を調査した (表 1)。なお、牛の年齢は、0 歳 1 頭、1 歳 3 頭、2 歳 5 頭、3 歳 8 頭、4 歳以上 43 頭であった。対象牛の心筋を用い、田中らの方法〔3〕に従い 18S リボソーム DNA を標的とした PCR 法により、*Sarcocystis* の寄生の有無を調べた。また、心筋中のシストを実体顕微鏡により直接検出する方法 (直接法) を同時に行った (図 1)。さらに一部の検体について、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより種の同定を試みるとともに、免疫組織化学検査により、食中毒の原因となる 15kDa タンパクの有無を調べた〔4〕。

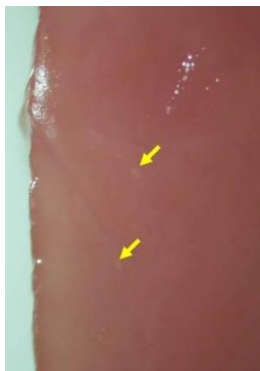


図 1 筋肉内のシスト

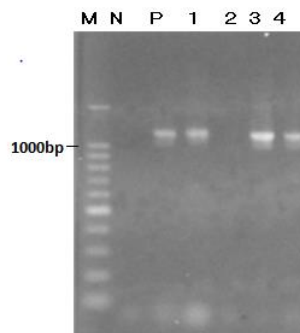


図 2 PCR 泳動像

M : 100bp マーカー, N: 陰性コントロール, P: 陽性コントロール, 1~4: サンプル



図 3 免疫染色像

3. 結果

PCR で 52 検体 (87%) が、陽性と判定された (図 2)。シストが確認された 43 検体中全例が PCR 陽性であった。PCR の陽性率は、ホルスタイン種 89%、ジャージー種 77%であったが、年齢による差は認められなかった。シストの確認及び PCR 法ともに陽性の 1 検体、PCR 法のみ陽性の 1 検体について BLAST 検索を行ったところ、ともに *Sarcocystis cruzi* であることがわかった。また、シストが確認された 43 検体のうち 4 検体について 15kDa タンパクの有無を調べたところいずれの検体からも検出された (図 3)。

表1 直接法及びPCR法の結果

品種	直接法	PCR法
ホルスタイン	35/47(75%)※	42/47(89%)
ジャージー	8/13(62%)	9/13(77%)

※陽性数/検査数（陽性率）

4. ま と め

今回の調査により、県内産牛が、高率に *Sarcocystis* に感染していることが明らかになり、シーケンス結果から、それらが *S. cruzi* であると推察された。今回の感染率は、他の研究者の報告とほぼ同様であり、岡山県でも *Sarcocystis* の浸潤状況が他地域と同レベルにあることがわかった。また一部検体ではあるものの、15kDa タンパクが検出された。牛肉を原因とした *Sarcocystis* による食中毒事例はこれまで確認されていないが、牛肉には *Sarcocystis* が含まれる可能性が高いことから牛肉は十分加熱して喫食することが重要と思われる。

5. 文 献

- 〔1〕 松尾加代子ほか：牛肉における住肉胞子虫感染の現状、日獣会誌 66, 638～640（2013）
- 〔2〕 松尾加代子ほか：岐阜県内だと畜された牛の住肉胞子虫調査、日獣会誌 65, 791～794（2012）
- 〔3〕 田中成幸：平成23年度埼玉県業務概要 47～48
- 〔4〕 斉藤守弘：平成25年度埼玉県業務概要 53～54

原因菌の同定に苦慮した悪性水腫の一例

藤澤幸平

1 はじめに

牛の悪性水腫は、皮下および筋肉における浮腫と多量のガス産生を特徴とする感染症で、*Clostridium septicum*, *C. sordellii*, *C. perfringens* (A型), *C. novyi* (A型) が原因菌とされている [1]。以前、我々は解体所見および病理組織所見から悪性水腫を強く疑う所見が認められたが、鞭毛蛋白(フラジェリン)遺伝子をターゲットとした multiplex PCR [2] により、原因菌が *C. haemolyticum* と推定されたため、悪性水腫と診断しえなかった症例 [3] を経験した。

今回、その原因菌のフラジェリン遺伝子および *16S rRNA* 遺伝子解析を行った結果、新奇なフラジェリン遺伝子を保有する *C. novyi* (A型) であると考えられたので、その概要を報告する。

2 材料及び方法

(1) フラジェリン遺伝子検査

佐々木らの方法 [2] によるフラジェリン遺伝子をターゲットとした multiplex PCR を行うと同時に、各菌種に対する特異プライマーを用いた simplex PCR も行った。得られた増副産物についてダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定し、BLAST 検索を行った。

(2) *16S rRNA* 遺伝子による原因菌の同定

日本薬局方 [4] に示されている方法に従い、*16S rRNA* をターゲットとした 10F/800R プライマーセットを用いて PCR を行った。得られた増副産物についてダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定し、BALST 検索を行った。また佐々木らの報告 [5] にある *C. novyi* (A型) および *C. haemolyticum* 近縁 5 菌種の *16S rRNA* 遺伝子と比較し、同定を行った。

3 成績

(1) フラジェリン遺伝子の検査結果

multiplex PCR では、*C. haemolyticum* の特異バンド (694bp) に相当する部分に 2 本のバンドが確認された。確認のため、各菌種ごとのプライマーセットを用いた simplex PCR を行ったところ、*C. novyi* (A型) および *C. haemolyticum* 特異プライマーセットにおいて、それぞれ約 700bp 付近にバンドが確認された (図 1)。そこで各産物の塩基配列を

決定し、BLAST 検索を行ったところ、*C. haemolyticum* 特異プライマーセットによる産物 (671bp) は、*C. haemolyticum* のフラジェリン A 遺伝子と最も高い相同性を示したが、その値は 87%に過ぎなかった。*C. novyi* (A 型) 特異プライマーセットによる産物 (700bp)

は、5'末端側約 300bp の配列が *C. botulinum* (D/C 型) のフラジェリン C 遺伝子と最も高い相同性 (90%) を示したが、後半約 400bp に類似した配列情報は認められなかった。

(2) *16S rRNA* 遺伝子による原因菌の同定結果

シーケンスによって決定された塩基配列 (675bp) を BLAST 検索にかけたところ、*C. novyi* (A 型) の *16S rRNA* 遺伝子と 100% 一致した。また、近縁 5 菌種の *16S rRNA* 遺伝子配列との相同性は、*C. novyi* (A 型) と 100%、*C. haemolyticum* と 98%、*C. novyi* (B 型) と 98%、*C. septicum* と 90%、*C. chauvoei* と 89% 一致した (表 1)。

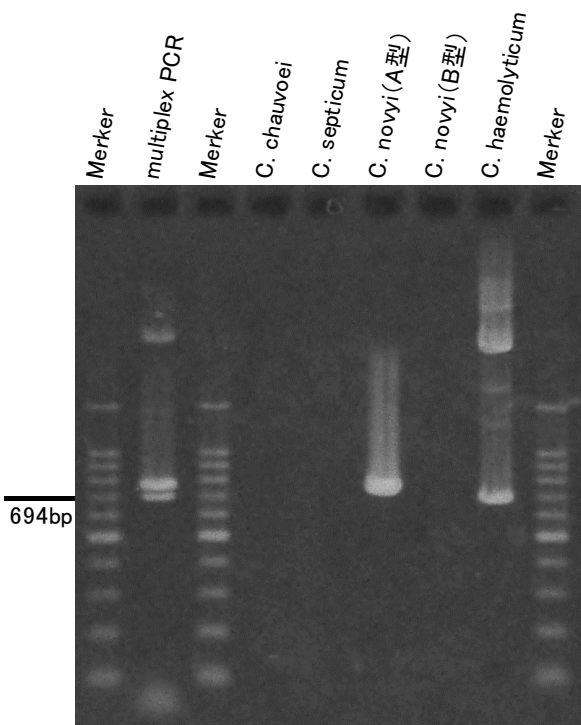


図1 multiplex PCRおよびsimplex PCR泳動像

菌種	由来株	GenBank accessin no.	相同性 (%)
<i>C. chauvoei</i>	ATCC 10092	U51843	89
<i>C. septicum</i>	ATCC 12464	U59278	90
<i>C. novyi</i> (A型)	JCM 1406	AB045606	100
<i>C. novyi</i> (B型)	ATCC 25758	AB035087	98
<i>C. haemolyticum</i>	ATCC 9650	AB037910	98

表1 比較に使用した *16S rRNA* 遺伝子配列情報と相同性

4 考 察

原因菌については当所、フラジェリン遺伝子を標的とした multiplex PCR により、*C. haemolyticum* と同定したが、PCR 産物のシーケンス解析から、それが正しくなかったことが示され、最終的に *16S rRNA* 遺伝子のシーケンス解析結果により、*C. novyi* (A 型) であることがわかった。したがって、今回の症例は、新奇なフラジェリン遺伝子を保有する *C. novyi* (A 型) による悪性水腫であったと結論付けられた。

C. chauvoei、*C. septicum*、*C. novyi* (A 型)、*C. novyi* (B 型)、および *C. haemolyticum* の 5 菌種については、クロモゾーム上に少なくとも 2 セット以上のフラジェリン遺伝子が存在し、各セットの 5' および 3' 末端の配列はよく保存されているが、中間部の配列は多様性に富むことが示されている [6]。佐々木らはこの点に着目し、5' 末端に菌種共通のフォワードプライマーを、中間部に種特異的リバープライマーを設定することで、菌種同定可能な multiplex PCR を開発した。[6] 今回同定された *C. novyi* (A 型) も、5' 末端に

については他のクロストリジウム属菌と類似した配列であったことから、フォワードプライマーは結合したものの、その一方で、中間部の配列は既知の菌とは大きく異なっていたにもかかわらず、リバースプライマーがミスアニーリングを起こし、結果として誤同定に至ったものと考えられた。

本研究により、multiplex PCR が適用できないような新奇なフラジェリン遺伝子を持つ *C. novyi* (A型) の存在が、今回はじめて明らかになった。今後、このようなタイプの *C. novyi* (A型) による感染が、どの程度広がっているのかについて、更なる調査が必要である。

5 まとめ

過去に病畜として搬入された牛は、解体所見、病理組織所見から悪性水腫を強く疑ったが、フラジェリン遺伝子をターゲットとした multiplex PCR 検査により、悪性水腫の原因とされない *C. haemolyticum* が原因菌と推測され、悪性水腫と診断されなかった。

しかしその後、原因菌のフラジェリン遺伝子伝と *16S rRNA* 遺伝子配列の決定、比較により、*C. haemolyticum* と推測された原因菌は、新奇のフラジェリン遺伝子を保有する *C. novyi* (A型) であることが判明し、本症例は悪性水腫と診断された。

今後、同様の症例に遭遇した場合は注意が必要であり、このようなタイプの *C. novyi* (A型) による感染が、どの程度広がっているのかについて、更なる調査が必要である。

6 文献

- [1] 農林水産省消費・安全局監修. : 病性鑑定マニュアル第4版;150~152,2016
- [2] 佐々木貴正ら. : 獣医畜産新報. 55巻:889~893,2002
- [3] 全国食肉衛生検査所協議会 第68回病理研修会 演題 No.2301 牛の筋肉
- [4] 第十六改正日本薬局方 2029~2031,2011
- [5] Sasaki.Y.et.al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51;901~904,2001
- [6] Sasaki.Y.et.al. *Veterinary Microbiology*, 86;257~267,2002

牛の皮膚

橋本 英典

症例：牛（ジャージー種），メス，24ヶ月齢

臨床的事項：一般畜として搬入されたが、体表に多数の腫瘍が認められ、悪臭もあったため、場内病畜として処理した。

肉眼所見：左前肢手根関節周囲に直径約 30cm の巨大腫瘍（図 1）。その他、右下眼瞼に直径約 5cm、胸垂部から陰部にかけての皮膚に数 mm～数 cm の腫瘍を多数認めた。内臓は、心臓の心筋変性、肝臓の巣状性脂肪変性を認めた。また、脾臓は中央部に切れ込みがあり、半分が腫大していた。その他、内臓所見について異常を認めなかった。

組織所見：皮膚最大腫瘍の辺縁部は、角質層の肥厚、有棘細胞及び基底細胞の増生が著しく、顆粒細胞の風船様変性や両染色核内封入体、ケラトヒアリンも認められた。中心部は、白色で硬質な組織であり、アザン染色及びエラスチカ・ワンギーソン染色により膠原線維の高度な増生を確認した。皮膚最大腫瘍の辺縁部及び中心部の組織から抽出した DNA について、牛パピローマウイルス(BPV)を標的とした PCR 法 (Carvalho,et.al.2013) を実施したところ、特異バンド (475bp) が確認され、ダイレクトシーケンスにより、感染ウイルスは BPV1 型と同定された。

診断名：膠原繊維の増生を認める牛の BPV-1 型感染による皮膚乳頭腫

その他：腫瘍の中からゴム状の異物がみられたため荷主に聞いたところ、出荷者が腫瘍を取るために腫瘍の根元にゴムひもを巻き付けたという話だった。



(図 1)