

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27年5月14～15日 |
| 全国食肉衛生検査所所長会議 | 岡山市 | 2名 | 平成27年7月22～23日 |
| 岡山県・岡山市・倉敷市 食品衛生監視員研修会 | 岡山市 | 4名 | 平成27年7月31日 |
| 岡山県獣医公衆衛生学会 | 岡山市 | 4名 | 平成27年8月7日 |
| 中国地区 食品衛生監視員研究発表会 | 広島県 | 1名 | 平成27年8月27日 |
| 全国公衆衛生獣医師協議会総会 及び調査研修発表会 | 東京都 | 1名 | 平成27年9月4日 |
| 全国食肉衛生検査所協議会 理化部会 | 茨城県 | 1名 | 平成27年10月2日 |
| 日本獣医公衆衛生学会（中国） | 岡山市 | 3名 | 平成27年10月10～11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 | 島根県 | 2名 | 平成27年10月15～16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27年11月17～18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27年11月19～20日 |
| 食肉衛生技術研修会 衛生発表会 | 東京都 | 1名 | 平成28年1月18～19日 |
| 食鳥肉衛生技術研修会 衛生発表会 | 東京都 | 1名 | 平成28年1月20～21日 |
| 岡山県獣医師会公衆衛生講習会 | 岡山市 | 2名 | 平成28年2月10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28年2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 27 年 8 月 7 日 | 中 国 地 区 日 本 獣 医 公 衆 衛 生 学 会 | Tと畜場に搬入された牛白血病ウイルス感染牛における腫瘍由来細胞の組織学的・分子生物学的検討 | 橋 本 英 典 |
| | | 岡山県における牛白血病ウイルスの流行状況と遺伝子解析 | 葛 谷 光 隆 |
| 平成 27 年 8 月 27 日 | 中 国 地 区 食 品 衛 生 監 視 員 研 究 発 表 会 | Tと畜場に搬入された牛のサルモネラ菌の保菌状況 | 狩 屋 英 明 |
| 平成 27 年 10 月 15～16 日 | 全 国 食 肉 衛 生 検 査 所 協 議 会 中 四 国 ブ ロ ッ ク 研 修 会 | | |

【中国地区 日本獣医公衆衛生学会】

公衆衛生

Tと畜場に搬入された牛白血病ウイルス感染牛における腫瘍由来細胞の組織学的・分子生物学的検討

○橋本英典 葛谷光隆

岡山県食肉衛生検査所

1. はじめに：牛白血病は、牛白血病ウイルス(BLV)が原因とされている地方病性白血病(成牛型)をはじめ、子牛型、胸腺型及び皮膚型の4種類に分類されており、近年、その増加が全国的に問題となっている。今回、当所所管のTと畜場において平成26年度に牛白血病と診断した検体について、リンパ球マーカーを用いた免疫組織化学的染色(IHC)による腫瘍由来細胞の組織学的分類を行うと共に、BLV遺伝子の検出及び遺伝子型別分類を実施した。

2. 材料及び方法：平成26年度に当所所管のTと畜場に搬入された牛で、肉眼病理学的検査及びHE染色による組織学的検査等により総合的に牛白血病と診断した25頭について、品種、月齢、肉眼所見等による発生状況の疫学的特徴を調査した。IHCによる腫瘍由来細胞の組織学的分類については、定法により作成したパラフィン切片により、一次抗体として抗ヒトCD3、抗ヒトCD79 α (以上、DAKO社)、抗ヒトTdT(ニチレイ)を使用し、ポリマー法により試験を実施した。BLV遺伝子の検出については、25頭の血液又は病変部位からnested-PCR法によるプロウイルスの検出を行い、制限酵素によるBLV遺伝子型別分類も実施した。

3. 結果及び考察：牛白血病感染牛は、ホルスタイン種が17頭(68%)であり、月齢は4歳以上の牛が22頭(88%)を占めた。臓器別に腫瘍を確認したところ、リンパ節及び心臓が22頭と他の部位に比べ腫瘍の出現率が高かった。HE染色による病理組織学的検査では、腫瘍細胞はいずれも高度～中程度の多形性及び異形性を示した。IHCによる腫瘍由来細胞分類について、25頭中24頭はCD3(-)、CD79 α (+)、TdT(-)であったことから、動衛研の門田らの組織型分類から「BLV関連多形型B細胞性リンパ腫」と判定したが、1頭については抗原抗体反応が弱く染色困難であったため判定不能とした。また、対象となった25頭全てからBLV遺伝子が検出され、遺伝子型別分類を実施したところ、1型が20頭(80%)、3型が5頭(20%)であった。今回は、IHCとBLV遺伝子検出の結果の関連は認められたが、BLV遺伝子型別分類結果との関連は認められなかった。全国でBLV関連のT細胞性リンパ腫の存在が報告されていることから、更に検査結果を蓄積し、より確実な牛白血病診断の一助としたい。

【中国地区 日本獣医公衆衛生学会】

公衆衛生

岡山県における牛白血病ウイルスの流行状況と遺伝子解析

○葛谷光隆 橋本英典

岡山県食肉衛生検査所

1. はじめに: 昨年の本学会において、県内産牛の白血病は過去 5 年間で増加傾向にあること、また一部の牛の調査により、県内で 2 種類の遺伝子型の牛白血病ウイルス(BLV)が流行していることを明らかにした。しかしながら、県内で流行している BLV に関する詳細な調査はほとんど行われていない。そこで、白血病罹患の県内産牛(県内産罹患牛)について BLV 検索を追加実施するとともに、検出されたウイルスについて遺伝子解析を行ったので報告する。

2. 材料および方法: 平成 21~26 年度にTと畜場で発見された県内産罹患牛 119 頭のうち、腫瘍臓器等が保存されていた 84 頭(44 農場由来)を検査対象とした。対象牛の臓器等(凍結:30 件、包埋 54 件)から市販キットで抽出した DNA について、まず内在性 β -アクチン遺伝子の検出を行い、陽性例について Fechner ら(1997)の報告に基づく PCR 法により BLV プロウイルスの有無を調べた。また、増幅産物を 3 種類の制限酵素(*Bcl* I、*Hae*III、*Pvu*II)で切断することにより遺伝子型を決定した。

3. 成績: 84 検体中 62 検体(凍結 30 件、包埋 32 件)が β -アクチン遺伝子陽性であり、陽性例すべてから BLV 遺伝子が検出された。BLV 陽性例のうち 59 件が遺伝子型別可能で、その結果は 1 型が 45 件、3 型が 8 件、5 型が 2 件、6 型が 2 件、1 型・3 型混合が 1 件、1 型・5 型混合が 1 件であった。年度別では、1 型は全ての年度で検出されたのに対し、3 型及び 5 型はそれぞれ 3 カ年度で、6 型は平成 25 年度のみ検出された。牛の品種との関係では、黒毛和種で 3 型の割合が高い傾向がみられた。地域別では、6 型がいずれも美咲町内の農場由来牛から検出された以外は、遺伝子型分布に地域の特徴は認められなかった。解体時所見等との関係では、6 型が検出された牛のみで肝実質内に多数の腫瘍塊が観察された。

4. 考察: 本研究により、県内産罹患牛のほとんどが地方病性牛白血病であること、また県内で 4 種類の遺伝子型の BLV が流行していることが明らかになった。近県では、島根県で 1~4 型が、鳥取県で 1 型及び 5 型が、愛媛県で 1 型が検出されており、本県もこれらと同様の傾向にあると思われたが、6 型が検出されたのは中四国で初めてである。今後、6 型についてさらに詳しい遺伝子解析を行い、本ウイルスの由来等を明らかにしたいと考えている。

【中国地区食品衛生監視員研究発表会】

【全国食肉衛生検査所協議会 中四国ブロック研修会】

岡山県Tと畜場に搬入された牛のサルモネラ保菌調査

岡山県食肉衛生検査所 ○狩屋 英明

1 はじめに

牛サルモネラ症は 1990 年代以降、成牛（多くは搾乳牛）での発生が増加している。*Salmonella* serovar Dublin、Enteritidis、Typhimurium、Choleraesuis を原因とする感染症は、届出伝染病に指定されている。牛のサルモネラ症は、*Salmonella* Typhimurium 及び Dublin によるものが主体だが、これら以外の血清型による発生もあり、特に、牛は多種の血清型菌を健康保菌している。平成 11 年度の全国食肉衛生検査所協議会による調査では、牛のサルモネラ保菌率は 0.5% と低率であり、豚（4～7%）に比較して牛の保菌率は低いことが、多くの研究報告書に示されている。そこで、岡山県Tと畜場に搬入された牛の直腸内容のサルモネラ属菌の保菌率を調査したので報告する。また、牛大腸・小腸を洗浄処理し保管している冷蔵庫床面の拭き取り検査も行い、若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

牛の保菌調査期間は平成 27.4.13～5.13 までとした。生体所見で異常が認められなかった一般畜について、県内 43 農場（115 頭）及び県外 69 農場（97 頭）の計 212 検体を、病畜廃用牛について、県内 9 農場（9 頭）県外 1 農場（1 頭）計 10 検体を調査した。採取した直腸便 0.5g～1.0g をラポポート・バシリアディス（RV）培地 10ml に接種し、42℃で 22～24 時間増菌培養後、1 白金耳を MLCB 寒天培地および DHL 寒天培地に塗抹し、36℃で 18～24 時間分離培養を行った。分離培養後、サルモネラ属菌を疑うコロニーについて、TSI 及び LIM 培地で生化学的性状を確認し、サルモネラ免疫血清（デンカ生研）を用いた血清型を決定した。また、平成 27.2.24～5.8 にかけて牛内臓を保管する冷蔵庫の床面（腸管懸吊直下）約 400cm²を隔日で拭き取った。計 41 件について、サルモネラの分離試験を行った。EEM ブイヨンで前培養を行い、それ以降は直腸内容物と同様に試験した。分離されたサルモネラ属菌の病原遺伝子である、*invA*、*PhoE*、*spvC* は PCR で検査した。また、14 種類の BD センシディスクを用いた KB 法により、ストレプトマイシン、アンピシリン、セファゾリン、セファロチン、スルファメトキシゾール・トリメトプリム、オフロキサシン、ナリジキシン酸、オキシテトラサイクリン、カナマイシン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、ペニシリン、クロキシシリンの 14 薬剤について感受性試験を実施した。また、分離したサルモネラの 1 ヶ月冷蔵保存菌株及び新鮮培養株を用いて、生食浮遊菌の耐熱性試験により D 値を求めた。

3 結果

牛直腸内容検体 222 検体中 1 検体が陽性で、サルモネラ保菌率は 0.45% だった。陽性牛は一般畜で県外飼育農場 69 農場 97 頭中の 1 頭であった。分離菌は硫化水素産生・リジン脱炭酸反応陽性の典型的なサルモネラの性状を有し、血清型は *S. Mbandaka* (O7 : z10 : e,n,z15) であった。調査期間中、陽性農場からは、1 頭のみ搬入されていた。陽性牛をと畜した翌日の冷蔵庫拭き取りも含め、全ての拭き取り検体はサルモネラ陰性であった。分離された *S. Mbandaka* は病原遺伝子である *invA*、*spvC*、*PhoE* 全てを保有していた。薬剤感受性試験の結果、表 1 のとおり、ニューキノロン系薬剤であるオフロキサシンには高い感受性があり、第 1 世代キノロン系薬であるナリジキシン酸及びアンピシリン、ストレプトマイシン、オキシテトラサイクリンには中程度の感受性であった。エリスロマイシンには耐性であった。1 ヶ月間冷蔵保管した *S. Mbandaka* の生食浮遊菌の 53°C 及び 58°C 達温での D 値は表 2 のとおり、それぞれ、2.1~3.8 分及び 0.32 分であった。新鮮培養菌の耐熱性も 58°C 達温では同程度だった。

表 1 薬剤感受性試験結果

| 薬剤ディスク | 感受性 | 薬剤ディスク | 感受性 |
|------------|-----|---------------------|-----|
| ストレプトマイシン | I | アンピシリン | I |
| エリスロマイシン | R | セファロチン | R |
| クロラムフェニコール | S | スルファメトキシゾール・トリメトプリム | S |
| カナマイシン | I | オキシテトラサイクリン | I |
| ナリジキシン酸 | I | バンコマイシン | R |
| オフロキサシン | S | クロキサシリン | R |
| セファゾリン | R | ペニシリン | R |

S:感受性 I:中程度感受性 R:

耐性

表 2 分離されたサルモネラの D 値

| 加熱温度 | D 値 (分) |
|------|------------|
| 53°C | 2.1~3.8 |
| 58°C | 0.32 ※0.29 |
| 62°C | ※0.26 |
| 68°C | ※0.24 |

※新鮮培養株

4 考察

1980 年代までは乳用雄子牛でのサルモネラ症が北海道をはじめ各地で発生し、その後、1990 年代から乳用成牛での発生が見られるようになった。原因としては、泌乳量増大のた

めの濃厚飼料多給によるルーメン発酵の異常による揮発性脂肪酸の産生低下及びルーメン内の pH 上昇によることが示されている。牛の保菌率は鶏、豚に比較して小さいことが多くの研究報告書にすでに示されているが、岡山県 T と畜場に搬入される牛でも 0.45% と低率ではあるが、保菌していることがわかった。なお、サルモネラ陽性牛を処理した当日の腸管懸吊下の冷蔵庫床面は拭き取っていないが、翌日の床拭き取り検体は陰性であった。また、洗浄された牛内臓の冷蔵場所の床面拭き取りではサルモネラ属菌は検出されなかったことは、牛のサルモネラ保菌率の低さを反映しているものと思われた。分離された *S. Mbandaka* は病原遺伝子である *invA*、*spvC*、*PhoE* を保有していた。特に病原性プラスミド上にある *spvC* を保有していたことは、本菌は強病原性である可能性もある。上皮細胞への侵入性に関与する *invA* 遺伝子はほとんどのサルモネラ属菌が保有しており、本菌も保有していた。分離されたサルモネラは、臨床現場で使用されるニューキノロン系薬剤であるオフロキサシンには感受性であり、耐性化は認められなかった。アンピシリンも治療に使用されるが、中程度感受性であった。また、エリスロマイシンに対して耐性であった。わが国で分離される非チフス性サルモネラにはニューキノロン薬耐性はほとんどみられないことが報告されており、これと一致する結果であった。分離された *S. Mbandaka* の物理的性状として D 値を調べたが、1 ヶ月の長期冷蔵保存菌も新鮮培養菌も耐熱性に差は見られず、冷蔵状態では、長期間、耐熱性状を維持していることが判った。このことは、サルモネラの環境中での長期生残性にも関連するものと思われる。今後は、と畜場に搬入される家畜の保菌調査の継続と、サルモネラによる施設汚染についても調査する必要があると思われた。*S. Mbandaka* は人での感染の主要血清型ではないが、年間わずかながら発生報告はある。今後もさらに、衛生的な剥皮、内臓破損防止、食道結紮、直腸結紮等の衛生管理を徹底するよう継続指導することが重要と考えられた。