

Ⅲ 研究発表の記録

1 過去10年間の学会、研修会発表記録

発表年度	演 題 名	学 会、研 修 会	演 者 名
平成16年度	牛海綿状脳症（BSE）検査の現状	鳥取県公衆衛生学会 鳥取県獣医学会	松村 毅
	繁殖豚の胃内 Helicobacter 属細菌と病理組織変化	鳥取県公衆衛生学会 鳥取県獣医学会 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国・四国ブロック会議及び技術研修会 食肉及び食鳥肉衛生技術発表会（全国）	尾崎裕昭
	豚の回腸末端粘膜の腫瘍	全食協病理部会第50回研修会	織奥 学
平成17年度	と畜場搬入豚における豚丹毒の疫学的調査	鳥取県公衆衛生学会 鳥取県獣医学会 全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 中国地区公衆衛生学会	浅野智栄
	牛枝肉等への脊髓組織汚染調査及びその洗浄効果について	鳥取県公衆衛生学会 鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 食品衛生担当業務研究発表会 中国地区食品衛生監視員研究発表会	織奥 学
平成18年度	豚ムレ肉の発生にかかわる豚ストレス症候群関連遺伝子（豚骨格筋リアノジンレセプター変異遺伝子）の保有状況調査	鳥取県公衆衛生学会 鳥取県獣医学会 食品衛生担当業務研究発表会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 中国地区食品衛生監視員研究発表会 中国地区公衆衛生学会 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会 食肉及び食鳥肉衛生技術発表会（全国）	池田 稔
平成19年度	と畜場における牛処理工程の汚染状況とその改善指導について	食品衛生担当業務研究発表会 鳥取県公衆衛生学会 全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会	林原健吉 織奥 学

	病畜棟で解体処理された枝肉の衛生向上をめざして	食品衛生担当業務研究発表会 鳥取県獣医学会 中国地区食品衛生監視員研究発表会 日本獣医公衆衛生学会（中国）	佐倉千尋
	と畜不働化装置の効果の検討	全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会 食肉及び食鳥肉衛生技術発表会（全国）	池田 稔
平成 20 年度	牛白血病の発生状況と好発部位	鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国）	林原健吉
	と畜場における豚サルモネラ菌保有状況	鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会 食肉及び食鳥肉衛生技術発表会（全国）	木山真大
平成 21 年度	残毛対策を中心とした牛と畜処理の衛生改善	食品衛生担当業務研究発表会 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会 食肉衛生技術研修会・衛生発表会（全国）	岩尾 健
	野生動物の解体処理に関するアンケート調査および解体処理工程と処理された食肉の衛生管理に関する調査	食品衛生担当業務研究発表会 中国地区食品衛生監視員研究発表会 鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国）	最首信和
	豚と畜処理における枝肉の汚染要因の検討	食品衛生担当業務研究発表会 鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 食肉衛生技術研修会・衛生発表会（全国）	木山真大
平成 22 年度	豚および牛のサルモネラ属菌保有状況	食品衛生担当業務研究発表会	木山真大
	と畜場における豚のサルモネラ属菌汚染状況	中国地区食品衛生監視員研究発表会	木山真大
	豚と畜処理の高度衛生管理について	鳥取県公衆衛生学会	木山真大

	豚丹毒発生に伴う血清抗体価モニタリングと分離株の血清型、遺伝子型および生ワクチン由来株との識別	鳥取県獣医学会 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 食肉衛生技術研修会・衛生発表会（全国） 日本獣医師会獣医学術学会年次大会	最首信和
	病畜と畜検査の廃棄要因分析と各疾病の血液生化学的検査所見	鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国）	岩尾 健
平成 23 年度	と畜場における牛の腸管出血性大腸菌汚染状況調査	鳥取県公衆衛生学会 食品衛生担当業務研究発表会 中国地区食品衛生監視員研究発表会 鳥取県獣医学会 日本獣医公衆衛生学会（中国） 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会	木山真大
平成 24 年度	牛枝肉の拭き取り検査を活用したと畜場の衛生管理	食品衛生担当業務研究発表会（※） 鳥取県公衆衛生学会（※） 鳥取県獣医学会 中国地区食品衛生監視員研究発表会 獣医師会中国地区三学会 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会	水谷恵子 森原秀雄*
平成 25 年度	と畜場における牛内臓肉の汚染状況調査	食品衛生担当業務研究発表会 鳥取県公衆衛生学会 鳥取県獣医学会 中国地区食品衛生監視員研究発表会 獣医師会中国地区三学会 全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック会議及び技術研修会	水谷恵子
	敗血症を呈した牛から分離された大腸菌の病原性関連遺伝子の検索	全国食肉衛生検査所協議会微生物部会	

と畜場における牛内臓肉の汚染状況調査

鳥取県食肉衛生検査所 ○水谷恵子、井田 正己

1 はじめに

近年、食肉に起因する食中毒が多発しており、中でも牛の内臓肉やこれらからの二次汚染によるものと疑われる事例が数多く報告されている。

内臓肉は消化管を主体とする白物と、肝臓、心臓、肺、横隔膜、大動脈及びテールなどの赤物に分けられる。白物の管腔内には腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラなどの食中毒菌を保菌していることがあり、白物は食中毒菌に汚染されている可能性が高い。したがって白物を喫食する際の加熱不足や、白物の不注意な取り扱いによる精肉や赤物との交差汚染が食中毒の原因となる可能性がある。

枝肉については様々な調査研究が行われているが、内臓肉についての調査は少なく実態が不明であることから、今回県内のと畜場で調査を行ったので概要を報告する。

2 材料及び方法

(1) 大腸菌数、大腸菌群数及び一般細菌数の測定

平成 24 年 8 月 3 日から平成 24 年 8 月 24 日までに、県内と畜場に搬入され、と畜処理された牛を無作為に抽出し、計 11 頭を調査した。これらの牛について最終洗浄後に、小腸及び結腸については各 10 検体、盲腸、直腸、第二胃、第三胃及び第四胃については各 5 検体を採材した。検体量は 50g とし、腸管は両端から 25g ずつ採材し、両端を合わせて 50g とした。

検体を無菌的に細切し、25g 秤量し、各検体にリン酸緩衝生理食塩液を加え、ストマッカーで 1 分間処理したものを試験原液とし、10 倍段階希釈した。ペトリフィルム™ (3M) を用いて培養し、大腸菌、大腸菌群及び一般細菌について 1g あたりの菌数を測定した。

(2) VT 遺伝子検出試験

調査に供した 11 頭のうち 8 頭の検体について、1 検体につき大腸菌 2 株から 3 株をペトリフィルムから釣菌し、Sorbitol MacConkey Agar に画線培養した。分離菌株は酵母エキス-カシトン半流動培地で保存し、82 株について PCR 法 (TaKaRa O-157 PCR Typing Set) による VT 遺伝子の検出を行った。また VT 遺伝子が検出された菌株について、市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用い血清型別試験を行った。

3 成績

各検体の大腸菌数、大腸菌群数及び一般細菌数の平均値は図 1 のとおりであった。大腸

菌数及び大腸菌群数の平均値については盲腸が最も高く、一般細菌数については第二胃が最も高かった。大腸菌数については結腸が最も低く、大腸菌群数については第三胃が最も低く、一般細菌数については直腸が最も低かった。また 1 頭の結腸及び盲腸において、大腸菌数及び大腸菌群数が多く認められた。

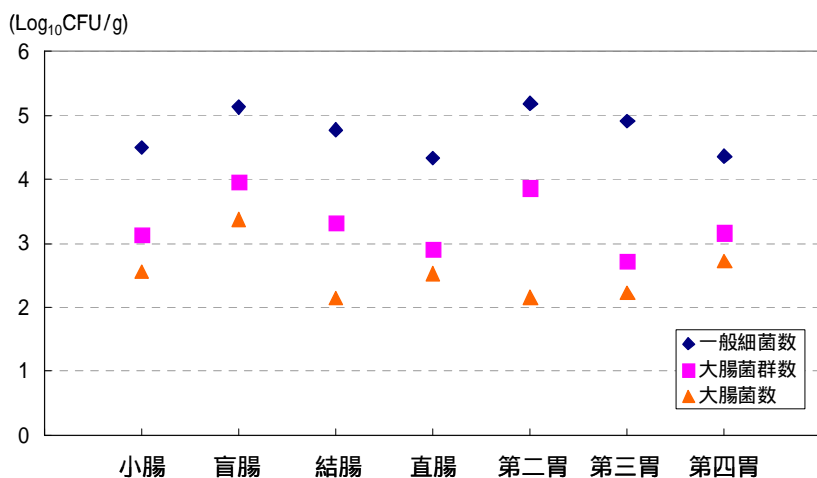


図 1 細菌数平均値 (小腸、結腸 N=10、その他 N=5)

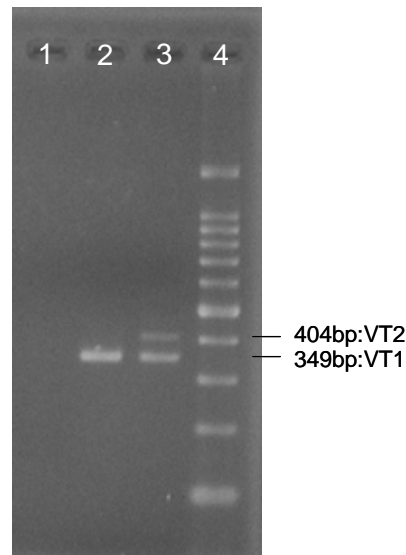


図 2 PCR 法による VT 遺伝子検出試験
1: Sample1 (Negative)
2: Sample2 (VT1 positive)
3: Positive control
4: 100bp DNA ladder

VT 遺伝子検出試験では、82 株中 1 株に VT1 遺伝子の保有が認められ、菌株は小腸由来であった (図 2)。この 1 検体について O 群について血清型別試験を行ったが型別不能であった。

4 考察

大腸菌及び大腸菌群についてはほとんどの検体で検出され、結腸に多いと予想していたが、各臓器にあまり差異はなく、一般細菌についても各臓器にあまり差異はなかった。

枝肉を衛生的に管理するためには洗浄が重要とされ、内臓肉についても洗浄工程を検討することで菌数を減少させることができると考えられた。腸管出血性大腸菌は 2 から 9 個の菌の摂取で食中毒が発生した事例が報告されており、死亡事例もある。本調査では 1 検体から腸管出血性大腸菌が検出された。このような菌が洗浄工程を経ても製品に付着し続けた場合や、他の内臓肉や枝肉への交差汚染が起きた場合に食中毒の原因となる可能性がある。今後は洗浄による菌数の変化や、定期的な菌数のモニタリングなどの調査を行い内臓肉の衛生管理を向上させることが必要であると考えられた。

5 引用文献

- 平成 22 年度厚生労働科学研究 食鳥・食肉処理工程等におけるリスク管理に関する研究 分担研究報告書 ウシ内臓肉処理工程の実態調査 重茂克彦
- 平成 16 年度厚生労働科学研究 食品製造の高度衛生管理に関する研究 分担研究報告書 と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査 品川 邦汎
- Verocytotoxigenic Escherichia coli, 1294-1304, OIE Terrestrial Manual 2008

敗血症を呈した牛から分離された大腸菌の病原性関連遺伝子の検索

鳥取県食肉衛生検査所 水谷 恵子、山本 香織、西田 昌樹、井田 正己

はじめに

大腸菌症は下痢原性大腸菌によるものと、尿路感染症、髄膜炎や敗血症などを引き起こす腸管外病原性大腸菌 (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC) によるものに分類され^[1]、特殊な接着因子^[2]、鉄捕捉因子や毒素などの病原因子を保有するとの報告がある^[3]。鶏においては全身感染を引き起こす家禽病原性大腸菌 (Avian pathogenic *E. coli*: APEC) が ExPEC の範疇に入り、APEC により引き起こされる大腸菌症による経済的被害は大きい^[4]。しかし家畜における ExPEC による大腸菌症は、下痢原性大腸菌によるものと比べると発生が少ない^[5]。今回敗血症を呈した牛に遭遇し、ExPEC による大腸菌症であると推察され、病原性関連遺伝子の検索を行ったので報告する。

材料及び方法

1 症例

当該牛は黒毛和種、雌、39 ヶ月齢で、起立不能及び食欲不振を主訴とし、腰痠の診断名で管内と畜場に病畜として搬入された。

2 理化学検査

血液一般検査及び血液生化学検査を実施した。

3 病理組織検査

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、子宮、膀胱、第一胃、第二胃、第三胃、第四胃、小腸、結腸、盲腸及び直腸について、定法に従い 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を実施し鏡検した。

4 微生物検査

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、子宮及び膀胱について羊血液寒天培地にスタンプし 37、48 時間、好気及び嫌気培養を行い、菌分離を行った。子宮及び膀胱から分離された菌について生化学的性状による同定キット API20E (シスメックスピオメリユー株式会社製) を用いて同定した。

分離された大腸菌については、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研株式会社製) を用い血清型別試験を実施した。また下痢原性大腸菌及び腸管外病原性大腸菌において報告がある毒素、付着因子、鉄取込能、莢膜及び侵入性の病原性に関連する計 28 の遺伝子 (表 1) について、プライマーの合成及び反応条件は既報^[3]に従い PCR 法により検索を実施した。得られた PCR 産物についてサイクルシーケンス法により、塩基配列を決定し、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により標的産物であることを確認した。

表 1 検索した病原性関連遺伝子

病原因子	病原性関連遺伝子
毒素	<i>cnf1</i> , <i>cnf2</i> , <i>cdt</i> , <i>colV</i> , STa, STb, LT, <i>stx1</i> , <i>stx2</i>
付着因子	F5, F41, F17A, F17a-A, F17b-A, F17c-A, F17d-A, <i>eae</i> , <i>afa-7</i> , <i>afa-8</i> , CS31A
鉄取込能	<i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i>
莢膜	<i>kpsMT</i> , <i>kpsMT</i>
侵入性	<i>ibeA</i> , <i>ipaH</i>

成 績

1 解体後検査及び行政処分

体幹脂肪組織、腸間膜、大網、脾臓、腎臓周囲、子宮及び膀胱に出血が認められた。また腎炎及び心筋炎が認められ、全身性出血性炎症として全部廃棄とした。

2 理化学検査

血液一般検査において、WBCの上昇、RBC及びHCTの低下が認められた。血液生化学検査において、GOT、Cholesterol、BUN、Ca、P及びCPKの上昇、Glucose、TP及びAlbuminの低下が認められた。

3 病理組織検査

心臓に軽度の出血及び炎症性細胞浸潤、間質性肺炎、肝臓に軽度の出血、脾臓の間質に出血及び炎症性細胞浸潤、間質性腎炎が認められた。また脾臓の被膜下平滑筋層に出血及び炎症性細胞浸潤、子宮内膜及び筋層に高度の出血及び炎症性細胞浸潤、膀胱の粘膜固有層及び粘膜下組織に高度の出血及び炎症性細胞浸潤が認められた。第一胃粘膜下組織に炎症性細胞浸潤、第四胃粘膜固有層及び粘膜下組織に炎症性細胞浸潤、盲腸粘膜固有層に出血及び炎症性細胞浸潤が認められた。

4 微生物検査

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、子宮及び膀胱から通性嫌気性グラム陰性桿菌を検出した。子宮及び膀胱から分離された通性嫌気性グラム陰性桿菌については大腸菌と同定され、血清型はO119:H28であった。

病原性関連遺伝子検索については、付着因子に関連する *afa-8*、鉄取込能に関係する *iutA*、*irp2* 及び *irp1* 並びに毒素に関連する *stx1*、*cnf2* 及び *cdt* が検出された。

考 察

本症例からは子宮及び膀胱から大腸菌 O119:H28 が検出され、ExPEC による敗血症と考えられた。

感染経路については、子宮及び膀胱において高度の炎症が認められたこと、間質性腎炎が認められたことから、泌尿生殖器感染症が全身へ広がったと考えられた。

また本症例に敗血症を起こした大腸菌は、付着因子に関連する *afa-8*、鉄取込能に関係する *iutA*、*irp2* 及び *irp1* 並びに毒素に関連する *stx1*、*cnf2* 及び *cdt* を保有しており、これらの病原性関連遺伝子が複合的に作用し敗血症を起こしたと推測された。付着因子に関連する *afa-8* については、非線毛性の付着因子であり、ヒトの尿路感染症における感染成立に重要な役割を果たしているとの報告や^[6]、牛の下痢症や敗血症との関与が指摘されている^[7]。鉄取込能に関連する *iutA*、*irp2* 及び *irp1* については、APEC において多く保有しているとの報告がある。全身感染が成立するためには、病原菌が増殖するために必要な鉄を宿主の体液から捕捉する必要があり、これらの鉄取込能に関連する遺伝子は病原性を理解する上で非常に重要である^[4]。毒素に関連する *stx1* については腸管出血性大腸菌症に関連することが知られている。*cnf2* は細胞毒性壊死因子、*cdt* は細胞膨化致死毒に関連する遺伝子であり、これらは下痢原性大腸菌の一部でも保有が認められ、敗血症の牛から分離した *cnf2* を保有する Necrotogenic *E.coli* type2(NTEC2)が、*cdt* や *afa-8* を保有するとの報告がある^[8]。また *cnf2* 及び *cdt* による毒素産生能を持ち、F17A または *afa-8* による付着因子と、*iutA*、*fyuA*、*irp2*、*irp1* などによる鉄取込能を持つ大腸菌は子牛 ExPEC 感染症に関連する可能性があるとする報告があり^[3]、本症例と保有遺伝子が類似していた。

家畜における ExPEC 感染症については不明なことが多いが、ひとたび発生すると敗血症を引き起こすなど経済的被害も大きく、今後も症例を集め、病態や病原性関連遺伝子の詳細な検討が必要と考えられた。

謝 辞

菌株分与に御協力いただいた福島県中家畜保健衛生所の大西英高先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.: Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140(2004)
- [2] 坂崎利一ほか：腸内細菌（下巻）第3版、75-106（1992）
- [3] 菅原克ほか：子牛の腸管外病原性大腸菌感染症と PCR による分離株の病原関連遺伝子の検索についての報告、日獣会誌、65、689-693(2012)
- [4] 秋庭正人：腸管外病原性大腸菌感染症としての鶏大腸菌症、医学のあゆみ、235(4)、345-350（2010）
- [5] 中沢宗生：大腸菌症、牛病学、第2版、304-307(1988)
- [6] Le Bouguéne C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia MI : Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens, *J Clin Microbiol*, 39(5), 1738-1745(2001)
- [7] Lalioui L, Jouve M, Gounon P, Le Bouguenec C : Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves, *Infect Immun*, 67(10), 5048-5059(1999)
- [8] Van Bost S, Bâbe MH, Jacquemin E, Mainil J : Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970, *Vet Microbiol*, 82(4), 311-320(2001)