

第 5 章

研 修

及 び

調 査 研 究 等

1 技術研修等

研修会等の名称	場所	期間
食肉衛生検査研修	和光市	令和6年6月10日 ～7月5日
全国食肉衛生検査所協議会 微生物部会研修会	静岡市	令和6年9月18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	徳島市	令和6年10月31日 ～11月1日
全国食肉衛生検査所協議会 理化学部会研修会	横浜市	令和6年10月4日
全国食肉衛生検査所協議会 病理部会研修会	相模原市	令和6年10月31日 ～11月1日
食肉及び食鳥肉衛生技術研修会 並びに研究発表会	東京都	令和7年1月22日 ～23日

2 講演及び研究発表

年月日	学会等の名称	題名	発表者
令和6年 8月2日	岡山県獣医 公衆衛生学会	枝肉洗浄機による牛枝肉各部位の洗浄 消毒効果の検証	白石 順也
		牛乳頭腫から検出された牛パピローマ ウイルスの遺伝子型とその特徴	太田 諭志
令和6年 10月19日・ 10月20日	獣医学術 中国地区学会	枝肉洗浄機による牛枝肉各部位の洗浄 消毒効果の検証	白石 順也
		牛乳頭腫から検出された牛パピローマ ウイルスの遺伝子型とその特徴	太田 諭志
令和6年 10月31日	全国食肉衛生検査所協議会 中国・四国ブ ック技術研修会	<i>Fusobacterium necrophorum</i> により黒毛 和種の心筋等に微小膿瘍を多発した一 例	片田 理志

枝肉洗浄機による牛枝肉各部位の洗浄消毒効果の検証

○白石順也 片田理志 椿 愛

はじめに

管内と畜場では、牛枝肉を高圧水で手動洗浄を行った後、枝肉洗浄機（以下「洗浄機」という。）を用いて水による洗浄及び消毒液による消毒を行っている。洗浄機では枝肉の両面に洗浄水及び消毒液を噴射するが、枝肉の形状ゆえ洗浄水や消毒液が届きにくく、微生物汚染の低減が十分でない部位が存在する。このため、洗浄機投入前後の枝肉表面の一般生菌数（以下「菌数」という。）を部位別に測定し、細菌による汚染状況を比較することで、衛生指導に関する若干の知見を得たので、その概要について報告する。

材料および方法

令和5年12月から令和6年5月にかけて、管内と畜場で処理された牛15頭の左枝肉の表面5か所（臀部、ともばら、頸部、胸腔、前肢内側）をふきふきチェックII（栄研化学）を用いて拭き取った。（図1）

拭き取りは洗浄機による洗浄の直前と直後にそれぞれ行い、ペトリフィルムAC（3M）を用いて30°C48時間培養後に菌数を測定した。同時に拭き取り部位の獣毛や糞便等の肉眼的な汚れの有無も確認した。

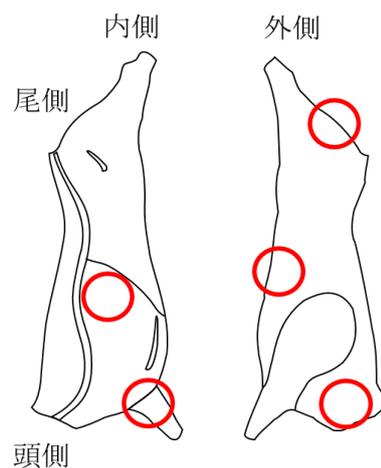


図1 ふき取り部位

成績

洗浄機投入前の菌数の平均値は各部位で1.97～3.20logCFU/cm²であり、ともばら及び前肢内側は頸部及び胸腔と比較して有意（ $p < 0.05$ ）に菌数が多かった。（図2）

枝肉部位	平均値 (logCFU/cm ²)
臀部	2.44
ともばら	2.82
頸部	1.97
胸腔	2.02
前肢内側	3.20

ともばら：頸部、胸腔に対して有意差あり
 前肢内側：頸部、胸腔に対して有意差あり
 (p<0.05)

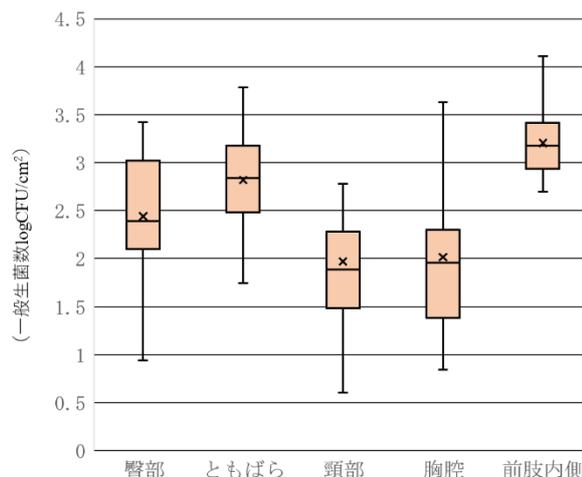


図2 洗浄機投入前の菌数

洗浄機投入後はいずれの部位でも投入前と比較して有意に減少して 0.78～2.44logCFU/cm²となった。ともばらは頸部及び胸腔、前肢内側は頸部、胸腔及び臀部と比較して有意に菌数が多かった。(図3)

枝肉部位	平均値 (logCFU/cm ²)
臀部	1.53
ともばら	2.09
頸部	0.78
胸腔	0.90
前肢内側	2.44

ともばら：頸部、胸腔に対して有意差あり
 前肢内側：臀部、頸部、胸腔に対して有意差あり
 (p<0.05)

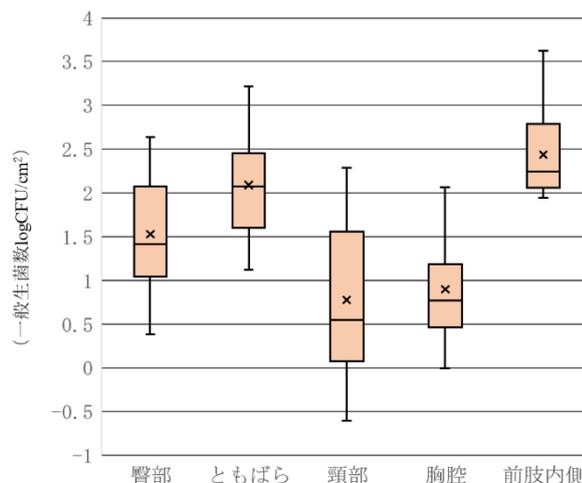


図3 洗浄機投入後の菌数

また、洗浄機使用による減少量は 0.73～1.19logCFU/cm²であり、ともばら及び前肢内側は頸部と比較して減少量が有意に少なかった。(図4)

枝肉部位	平均値 (logCFU/cm ²)
臀部	-0.91
ともばら	-0.73
頸部	-1.19
胸腔	-1.12
前肢内側	-0.77

ともばら：頸部に対して減少量が有意に少ない
 前肢内側：頸部に対して減少量が有意に少ない
 (p<0.05)

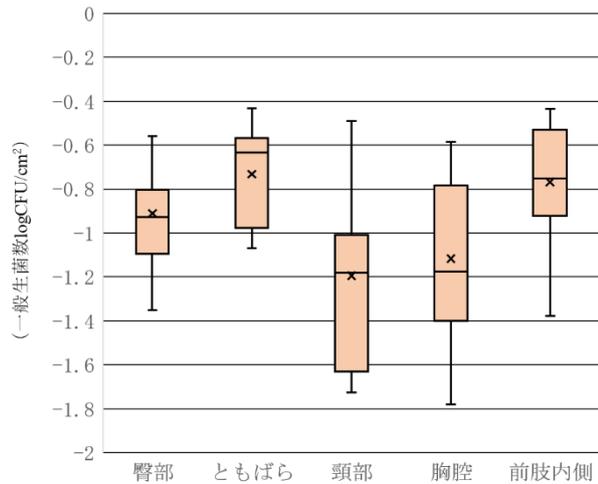


図4 洗浄機による減少量

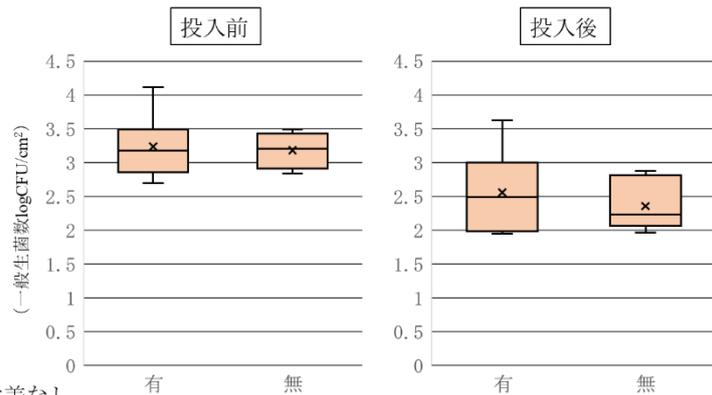
前肢内側については、洗浄前 7 検体で肉眼的な汚れを認め、残りの肉眼的な汚れを認めない検体と洗浄機投入前後で菌数を比較したが、それぞれ有意な差はなかった。(図5)

・ 洗浄機投入前

汚れ	平均値 (logCFU/cm ²)
有	3.23
無	3.18

・ 洗浄機投入後

汚れ	平均値 (logCFU/cm ²)
有	2.56
無	2.36



洗浄機投入前、投入後でそれぞれ有意差なし

図5 汚れの有無による菌数比較

考察

洗浄機はどの部位でも有意な菌数減少をもたらすが、ともばら、前肢内側では効果が比較的小さく、臀部、頸部、胸腔では効果的であった。効果が低かった原因としては、ともばらは洗浄水の噴射方向と平行の位置関係にあり当たりにくい、前肢内側は胸部や前肢自体の陰となるため洗浄消毒の効果が低くなるということが考えられた。また、今回は汚れの有無で菌数に差はなかったが、肉眼的な汚れは微生物汚染の要因となるため、汚染防止と汚染発見時の即時除去は重要である。今回の結果を基に重点的な洗浄やトリミングの指導を行い、と畜場の衛生管理の向上に努めたい。

牛乳頭腫から検出された牛パピローマウイルスの遺伝子型とその特徴

太田諭志 藤澤幸平¹⁾

1) 現岡山県備前県民局健康福祉部衛生課

はじめに

牛乳頭腫は、牛パピローマウイルス（以下「BPV」という）が皮膚や粘膜等に感染することによって形成される乳頭状、或いはカリフラワー状の腫瘍性病変で、BPVの遺伝子型により、病変の発生部位や形態等が異なることが報告されている [1]。食道等の消化管粘膜や皮膚が好発部位とされるが、と畜検査では、通常精査しない部位であることから、調査報告数は少ない。そこで、今回、と畜検査中に病変を発見し、採取することができた牛乳頭腫について病理組織学的検査を行い、BPV 遺伝子型を決定したので、その概要を報告する。

材料および方法

1. 検査材料

令和5年12月から令和6年2月に、と畜検査中に発見された罹患牛14頭を検体とした（表1）。採材部位は、食道11検体、皮膚2検体、口腔（舌）1検体を用いた。

表1. 罹患牛の内訳と採材部位

No.	品種	性別	月齢	部位
OKP1	ホルスタイン	雌	121	食道（噴門部付近）
OKP2	ホルスタイン	雌	64	食道（噴門部付近）
OKP3	ホルスタイン	雌	79	食道（噴門部付近）
OKP4	ホルスタイン	雄（去勢）	23	皮膚（耳介）
OKP5	ホルスタイン	雌	63	食道（噴門部付近）
OKP6	ホルスタイン	雌	65	食道（噴門部付近）
OKP7	ホルスタイン	雌	91	食道（噴門部付近）
OKP8	ホルスタイン	雌	48	食道（噴門部付近）
OKP9	ホルスタイン	雌	51	食道（噴門部付近）
OKP10	ホルスタイン	雌	42	食道（噴門部付近）
OKP11	ホルスタイン	雌	70	食道（噴門部付近）
OKP12	ホルスタイン	雌	83	口腔（舌）
OKP13	ホルスタイン	雌	38	食道（噴門部付近）
OKP14	ホルスタイン	雄（去勢）	17	皮膚（顔面）

2. 検査方法

(1) 病理検査

腫瘍の形成部位、肉眼的特徴を確認後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定

法により病理組織切片を作成した。染色方法は、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）及びエラスチカ・ワンギーソン染色（前田変法）により検査を行った。

（2）遺伝子検査

L1 蛋白遺伝子をターゲットとしたパピローマウイルス用プライマーペア（FAP59/FAP64）を用いて PCR を行った。その後、受託シーケンスにより遺伝子配列を解析し、パピローマウイルス専門サイト（<https://pave.niaid.nih.gov/index>）にて BLAST 検索により遺伝子型を決定、MEGA (Ver11.0.13) にて系統樹を作成した。

成績

1. 病理検査結果

病理組織学的検査の結果、12 検体が線維性乳頭腫、2 検体が上皮性乳頭腫と診断された（表2）。

表 2. 病理診断の結果

No.	部位	形状	診断名
OKP1	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP2	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP3	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP4	皮膚（耳介）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP5	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP6	食道（噴門部付近）	米粒	線維性乳頭腫
OKP7	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP8	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP9	食道（噴門部付近）	カリフラワー	上皮性乳頭腫
OKP10	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP11	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP12	口腔（舌）	カリフラワー	上皮性乳頭腫
OKP13	食道（噴門部付近）	豆粒	線維性乳頭腫
OKP14	皮膚（顔面）	豆粒	線維性乳頭腫

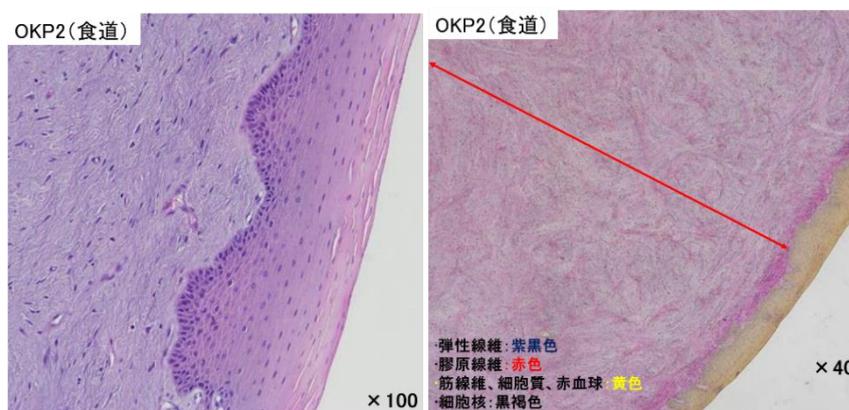


図 1. 線維性乳頭腫の一例。HE 染色（左図）及び前田変法（右図）による染色像。

HE 染色では、上皮層は重層扁平上皮で覆われ、正常な食道粘膜上皮に類似していた。また、一部粘膜固有層に紡錘形～不整形の細胞が見られ、不規則に配列していた。前田変法を試みたところ、粘膜固有層で膠原繊維の増生（赤色矢印）が確認された。

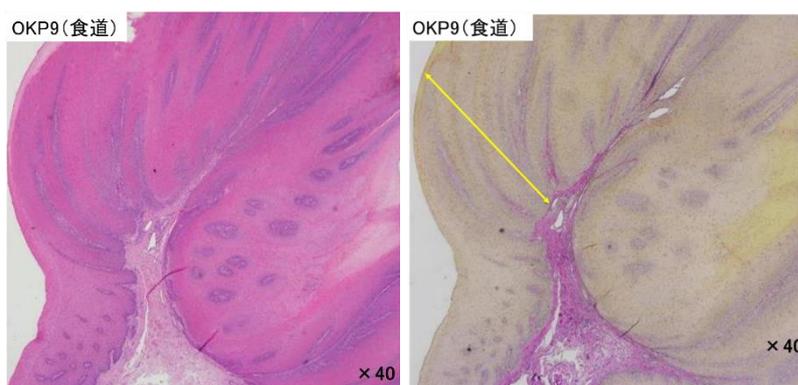


図2. 上皮性乳頭腫の一例。HE 染色（左図）及び前田変法（右図）による染色像。HE 染色では、上皮層、粘膜固有層において、正常細胞と類似した細胞が見られた。一方、前田変法では、上皮層の増生（黄色矢印）が確認された。

2. 遺伝子検査結果

PCR 検査の結果、14 検体全て陽性であった。さらにシーケンスを行ったところ、約 400bp の塩基配列が得られ、その内訳として BPV1 が 2 検体（食道）、BPV2 が 10 検体（うち食道 8 検体、皮膚 2 検体）、BPV12 が 1 検体（口腔（舌））、BPV15 が 1 検体（食道）と推定された（表 3）。

表 3. 遺伝子型の結果

No.	type	bp	相同率
OKP1	BPV2	402	99.3
OKP2	BPV2	402	98.8
OKP3	BPV2	402	99.3
OKP4	BPV2	402	99.3
OKP5	BPV2	402	99.3
OKP6	BPV1	413	100
OKP7	BPV1	413	100
OKP8	BPV2	402	99.3
OKP9	BPV15	395	99.5
OKP10	BPV2	402	99.3
OKP11	BPV2	402	99.3
OKP12	BPV12	408	100
OKP13	BPV2	402	99.3
OKP14	BPV2	402	99.3

考察

今回の結果から、BPV1、BPV2、BPV12 についての好発部位及び病理組織像は、従来の報告と一致していた [1,2]。一方、BPV15 については、国外の BPV 感染牛の皮膚から検出されたことが知られているものの [3]、日本国内では BPV15 として報告されている症例は少ない。今回の調査結果から、上部消化管に腫瘍を形成する牛の中には、BPV15 の感染が疑われるものが国内にも存在することが示唆された。今後は、症例を増やしながら、簡易的に検出できる PCR-RFLP 法等を用いて BPV の型別を行い、更なる調査を実施していく予定である。

参考文献

- [1] 畠間真一：新型牛パピローマウイルスとその関連疾患に関する最新の知見，動物衛生研究所研究報告 第 116 号，21-28(2010)
- [2] Zhu W., Dong J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y, Haga, T. (2012). Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Archives of Virology*, 157, 85–91.
- [3] Hu J, Zhang W, Chauhan SS, Shi C, Song Y, Zhao Y, Wang Z, Cheng L. Zhang Y.(2020). Complete genome and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus type 15 in Southern Xinjiang dairy cow. *Journal of Veterinary Science* 21(6): 1-10.

Fusobacterium necrophorum により黒毛和種の心筋等に微小膿瘍を多発した一例

岡山県食肉衛生検査所 ○片田 理志、藤澤 幸平¹⁾、白石 順也
太田 諭志、椿 愛

1) 現岡山県備前県民局健康福祉部衛生課

はじめに

Fusobacterium necrophorum は壊死桿菌症の起病菌として知られているが、心臓病変への関与はまれである。今回、当所が所管すると畜場に搬入された牛の解体後検査にて、心筋等に白色微小結節を多数認め、病理組織検査及び微生物学的検査により *F.necrophorum* によるものと診断したのでその概要を報告する。

材料及び方法

1. 対象牛

対象牛は令和6年2月1日に病畜として管内と畜場に搬入された。診断書情報は表1の通り。

表1 診断書情報

品 種	性別	月 齢	申告 病名	発 病 年月日	稟 告
黒毛和種	去勢	20	股関節脱臼	令和6年 1月31日	両後肢開脚、吊起するも起立維持 不可能

2. 精密検査

(1) 病理組織検査

心臓、腎臓、脾臓及び横隔膜を検体として10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法によりパラフィン切片を作成し、グラム染色及びヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により鏡検した。

(2) 微生物学的検査

① 直接鏡検

心臓及び腎臓の結節内容物をスライドグラスに直接塗抹し、グラム染色により鏡検した。

② 培養

5%ヒツジ血液加 TSA 培地上に心臓、腎臓、脾臓、横隔膜、リンパ節のスタンプリング並びに血液の塗抹を行い、好気・嫌気の両条件で 37℃・24 時間培養した。発育したコロニーから釣菌し、グラム染色により鏡検した。

③ 遺伝子検査

培養により発育した菌を単分離し、熱抽出法によって DNA 抽出を行った。16SrRNA の 10-800 領域を増幅するユニバーサルプライマーを用い、ユーロ

フィンジェノミクス株式会社に委託して、抽出物のシーケンス解析を実施した。

成績

1. 解体後検査所見

心臓、腎臓、脾臓、横隔膜に白色微小結節を多数認めた（図1）。住肉孢子虫の感染も疑い、心臓及び腎臓の結節を拡大鏡下で観察したがシストは認められず、微小膿瘍と推定された。



図1 心臓の白色結節肉眼像

2. 精密検査所見

(1) 病理組織検査所見

心臓、腎臓、脾臓、横隔膜のいずれにおいても、グラム染色像では結節辺縁部に多数のグラム陰性長桿菌が認められた（図2）。また、HE染色像では、白色結節内部は細胞構造が消失し、結節辺縁部の長桿菌の外側に多数の白血球が認められた（図3、4）。

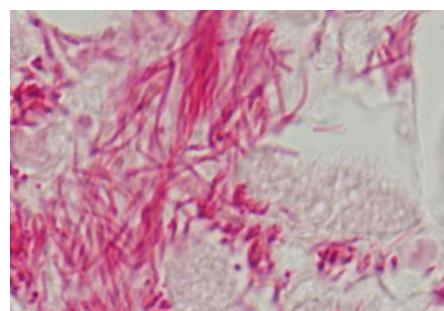


図2 心臓のグラム染色像(×1,000)

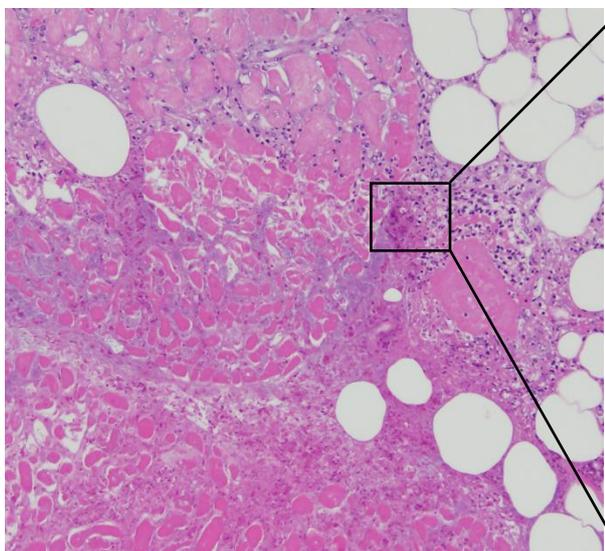


図3 心臓の HE 染色像 (×100)

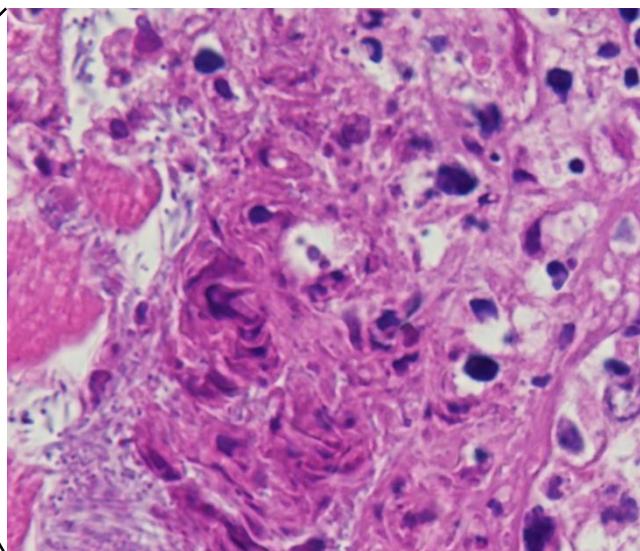


図4 心臓の HE 染色像 (×1,000)

(2) 微生物学的検査所見

① 直接鏡検

心臓、腎臓とも多数のグラム陰性長桿菌が認められた。心臓ではグラム陰性球菌も少数認められた。

② 培養

心臓及び腎臓の嫌気培養においてグラム陰性長桿菌が発育し、心臓の好気培養においてグラム陰性球菌が発育した。

③ 遺伝子検査

心臓及び腎臓の嫌気培養から分離されたグラム陰性長桿菌はいずれも *F.necrophorum* subsp. *necrophorum* と 100%の一致率を示した。また、心臓の好気培養から分離されたグラム陰性球菌は *Moraxella osloensis* と 100%の一致率を示した。

考察

本症例では心筋等に白色微小結節が多発しており、病変部に多数のグラム陰性長桿菌が認められたこと、分離されたグラム陰性長桿菌が *F.necrophorum* と同定されたことにより同菌による多発性微小膿瘍と診断した。*M.osloensis* も分離されたが、こちらは組織中に多数の菌体が認められず、主たる起因菌ではないと考えられた。

F.necrophorum は人や動物の口腔内等に常在する菌であり、牛の肝膿瘍及び内臓膿瘍、子牛のジフテリア、趾間腐爛の原因となる [1] が、牛の心臓病変への関与は疣贅性心内膜炎がわずかに報告されている [2] のみである。また、肺や脳の化膿性病変も報告されている [3、4] が、これらの症例では肝膿瘍を伴っている。対して本症例では心臓及び腎臓から同一菌が分離され、また脾臓及び横隔膜の組織像においても同様の細菌集簇が認められたことから、*F.necrophorum* が全身性に転移したものと考えられるが、肝臓での膿瘍形成は認められなかった。

一方で、心筋と横隔膜に微小膿瘍を多発する症例としては、過去に *Histophilus somni* によるものが報告されている [5]。本症例においても当初は *H.somni* の感染を疑ったが、検査結果から *F.necrophorum* による症状であることが明らかとなり、同菌による病型の多様さを示す結果となった。

引用文献

[1] 鹿江雅光：壊死桿菌症，獣医伝染病学，清水悠紀臣，鹿江雅光，田淵 清，平棟孝志，見上 彪編，第 5 版，130-131，近代出版，東京（1999）

[2] 谷口有紀子：肉用育成牛にみられた *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* による疣贅性心内膜炎 日獣会誌，73，506-509（2020）

[3] 瀧澤勝敏：牛の *Fusobacterium necrophorum* による多発性凝固壊死巣を特徴とする漿液性化膿性胸膜肺炎 農研機構，家畜衛生研修会（2009）
(<https://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/byori-kenshu/2009/2009-30.html>)

[4] 秋山 倫子：子牛の *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* による多発性脳膿瘍 農研機構，家畜衛生研修会（2016）
(<https://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/byori-kenshu/2016/2016-17.html>)

[5] 横山栄二：*Histophilus somni* による黒毛和種の心筋および横隔膜膿瘍の 1 例

日獣会誌 58, 275～277 (2005)