

# 養豚場における食肉検査結果の決定要因の主成分分析による解析法

深江征雄<sup>1)</sup> 大西綾衣<sup>2)</sup> 黒澤拓也<sup>3)</sup> 藤代れい一<sup>1)</sup> 横井智<sup>1)</sup> 大野博士<sup>5)</sup> 山形章<sup>1)</sup> 足立泰基<sup>1)</sup>

1) 根室保健所 2) 北見保健所 3) 帯広食肉衛生検査所 4) 東藻琴食肉衛生検査所  
5) 八雲食肉衛生検査所

## 【はじめに】

食肉検査結果を生産者に還元し、衛生的な食肉生産を促進する事業が複数の自治体で進められているが、食肉検査結果に依拠する生産段階における衛生対策に関する報告は少ない[1]。原因は、農場における対策の効果を廃棄臓器数等の経時データから評価

するのは容易ではないことと、食肉検査結果と飼養条件の関係に関する知見が乏しいことが原因である。前者の問題に対応するため、これまで食肉検査結果の時系列分析に関する研究を進めてきた[2,3]。さらに後者の問題に対応するため、管内の養豚場を対象に飼養条件に関するアンケートを実施し、食肉検査結果等と飼養条件の関係を調べることにした。両者は多次元のデータであるために関係が複雑であり、解析が困難であることが問題となるが、主成分分析を用いれば多次元データを低次元のデータに縮約でき、問題を克服できる可能性がある。

## 【材料及び方法】

2015年度に豚を管内食肉処理場に搬入した37生産者宛に飼養条件等に関する質問票(第1表)を送付し、30生産者(回答率81.1%)から回収した。これらのうち回収時点から遡って1年以内に搬入があり、全ての項目に回答した27生産者のデータを解析に用いた。食肉検査結果等からなる多次元データから累積寄与率70%をカットオフ値とした主成分分析を行ない、因子負荷量を調べることによって各主成分の解釈を行なった。次に各主成分それぞれとアンケート調査によって得た家畜の飼養条件との関係を重回帰分析(変数減少法)した。重回帰分析で有意差が認められた飼養条件につき、縮約前のデータと飼養条件の関係を一般化線形混合モデル(GLMM)で分析した。GLMMの条件として、確率分布を二項分布、リンク関数をlogit、ランダム効果を各養豚場とした。統計解析には、R Ver.3.1.3で行い、主成分分析にはprcomp関数、重回帰分析にはlm関数、GLMMモデルによる解析にはglmer関数をそれぞれ用いた。

## 【結果】

主成分分析によって得られた第1主成分(PC1)、第2主成分(PC2)および第3主成分(PC3)の累積寄与率は77.3%であり、第1図に二次元プロットで示した因子負荷量の特徴から、PC1を肥育豚の廃棄、PC2を産子数、そしてPC3を子豚死亡率に係る指標と解釈した。変数減少法による重回帰分析で有意であった21の組み合わせについてGLMMで解析した結果、食肉検査結果等に影響する8種類の飼養条件が見出された。第2図に、GLMMによる解析結果の例として、肝臓廃棄の有無と断尾の長さの関係を表す回帰曲線を示す。

## 【考察】

8種類の飼養条件のうち、オールイン・オールアウト、断尾、出荷日齢、駆虫剤、胸膜肺炎ワクチンおよび日本脳炎ワクチンの6種類については、先行研究の裏づけ[4-12]もあり、決定要因であると考えられる。飲用水の水源については、水道水よりも清浄度が低い沢水で臓器廃棄率が改善する傾向にあり、未知の交絡因子が存在すると考えられ、一群の頭数についても疾病との関係が不明であり、交絡因子が存在する可能性が高いと考えられる。本研究の結果を確認するために、介入研究を今後実施することを検討している。主成分分析による多次元データ

と畜場における豚の肺膿瘍に関する分子疫学調査

黒澤拓也<sup>1)</sup> ○井上陽介<sup>2)</sup> 山奈津子<sup>2)</sup> 横山敦志<sup>3)</sup> 池田徹也<sup>4)</sup> 内田玲麻<sup>5)</sup> 中山大輔<sup>5)</sup>  
村田亮<sup>5)</sup> 村松康和<sup>5)</sup>

1) 帯広食検 2) 東藻琴食検 3) 早来食検 4) 道立衛生研究所 5) 酪農学園大学

【はじめに】豚の肺炎は食肉検査における部分廃棄率が高い疾病の一つで、原因は細菌、マイコプラズマ、ウイルス等多岐にわたる。これらの複合感染を正確に把握することは健康状態の評価や疾病対策を講じる上で重要である。肺炎の中でも肺膿瘍は、と殺解体時の可食部汚染につながり、食品衛生上注意を要する。本研究は肺膿瘍を構成する細菌群の特定を目的として、網羅的細菌検索、統計解析を実施し、肺炎の起原菌として知られる *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) について性状解析を行った。

【材料および方法】1) 材料と培養：肺膿瘍発生率が高い農場 1 の肺膿瘍豚 (A 群) 50 頭、非肺膿瘍豚 (B 群) 50 頭、および肺膿瘍発生率が低い農場 2 の非肺膿瘍豚 (C 群) 35 頭より肺と扁桃を採集し、NAD 加血液寒天培地にて培養を行い、菌株を得た。2) 網羅的細菌検索：得られた菌株に対し、MALDI-TOF 質量分析システムによる網羅的同定を行った。3) App の検出と血清型別：グラム染色と NAD 要求性試験を行い、App が疑われる菌株は生化学性状試験と PCR 法による血清型別を実施した。

【成績】網羅的細菌検索では 1206 菌株を解析し、32 属菌を同定した。A 群の肺では 6 頭 (12%) で App の単独感染、28 頭 (56%) で App と *Pasteurella multocida* (PM)、*Escherichia coli* (EC)、*Staphylococcus aureus* (SA)、*Streptococcus dysgalactiae* (SD) 等との複合感染、12 頭 (24%) で App 以外の感染が認められた。他群の肺における App 感染は、B 群で 1 頭 (2%)、C 群は全て非感染であった。扁桃では SA と SD が農場 1 で有意に高かった ( $P < 0.05$ ) が、その他の菌では有意差が認められなかった ( $P > 0.05$ )。農場 1 の豚から分離され、生化学性状試験により App が疑われる菌株を PCR したところ 78 株が App であり、全て血清型 2 であった。

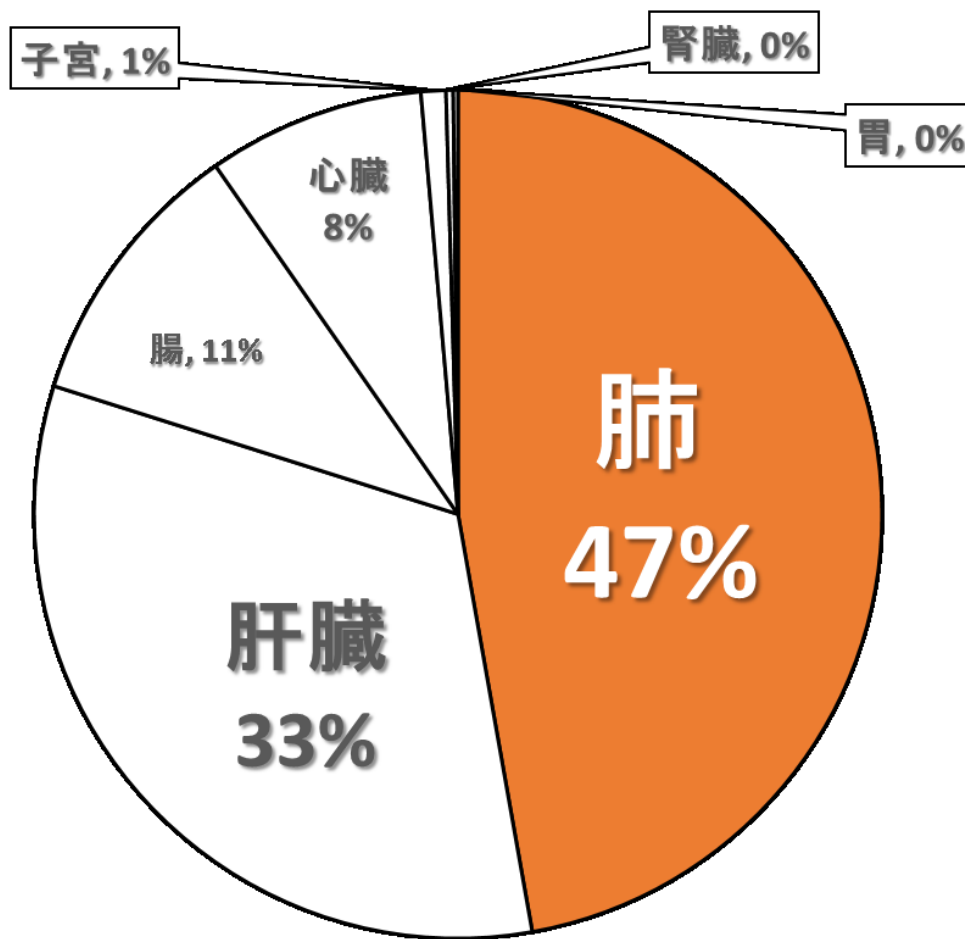
【考察】各群の比較では、A 群肺において有意に高かった App ( $P < 0.05$ ) は、肺膿瘍形成の起原菌であることが示唆された。また非肺膿瘍群との比較で、肺膿瘍群肺では有意に高かった EC と PM ( $P < 0.05$ ) は、肺膿瘍形成に関与していることが示唆された。農場 2 との比較で、農場 1 で有意に高かった SA と SD ( $P < 0.05$ ) は、肺膿瘍への間接的影響が示唆された。各細菌は枝肉重量にも悪影響であることから、対策が必要であると考えられる。

# と畜場における豚の肺膿瘍 に関する分子疫学調査

黒澤拓也1)、○井上陽介2)、山奈津子2)、横山敦志3)、池田徹也4)、  
内田玲麻5)、中山大輔5)、村田亮5)、村松康和5)

- 1) 北海道帯広食肉衛生検査所
- 2) 北海道東藻琴食肉衛生検査所
- 3) 北海道早来食肉衛生検査所
- 4) 北海道立衛生研究所
- 5) 酪農学園大学 獣医学群・獣医学類

# 豚の内臓部分廃棄（平成28年度実績）



肺の廃棄 ≡ **肺炎**

# 肺炎の病原体

細菌（App、パストレラ等）

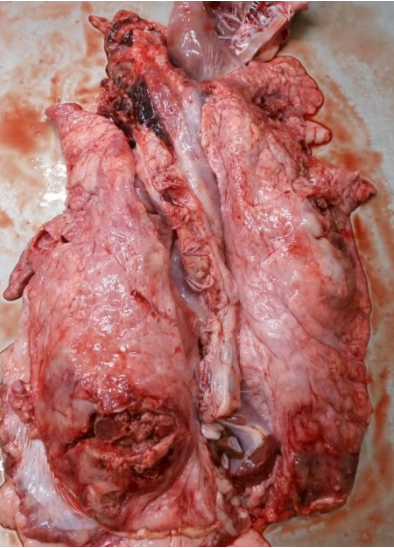
マイコプラズマ

ウイルス（PRRS等）

豚呼吸器複合病  
(PRDC)

肺炎対策には**感染状況の把握**が重要

# 肺炎の影響



- 体重増加の遅延

(肥育コスト↑)

- 肺膿瘍による汚染

(食肉検査における可食部廃棄)

家畜衛生および食品衛生  
双方にとって重要

# 本研究の目的

豚の肺炎に関して、細菌感染に着目し...

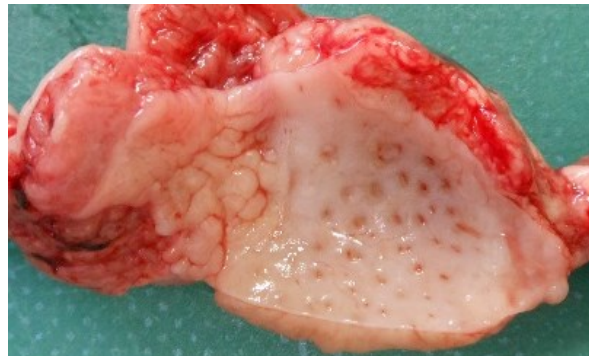
肺膿瘍を構成する細菌群の特定

# 材料

- 平成28年4月～平成29年1月にと畜場で処理された豚

	肺膿瘍豚	非肺膿瘍豚
農場1 (肺膿瘍発生多い)	50頭(A群)	50頭(B群)
農場2 (肺膿瘍発生少ない)		35頭(C群)

- 肺と扁桃を採取





# 細菌の同定



肺、扁桃より菌培養



単離、純培養



タンパク前処理(エタノール・ギ酸抽出法)



MALDI -TOF質量分析システム  
(MALDI-Biotyper)により網羅的に細菌同定

# (参考)MALDI -TOF質量分析システム



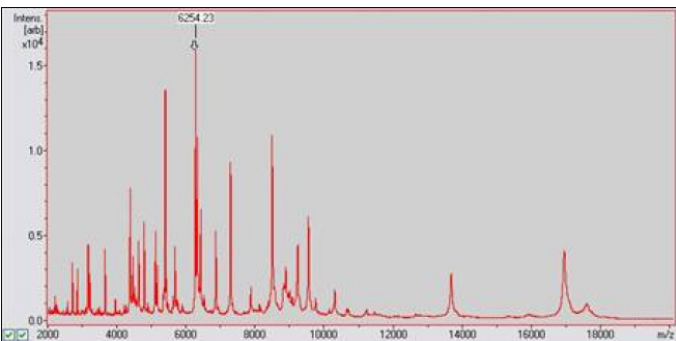
MALDI -TOF MS (Matrix Assisted-Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometer)という。

試料(タンパク)に窒素レーザーを照射し、イオン化させる。

そこに電圧をかけることで、イオン化した試料を検出器まで飛行させる。

検出器への到達時間の差を利用し、質量を分析、作図する。

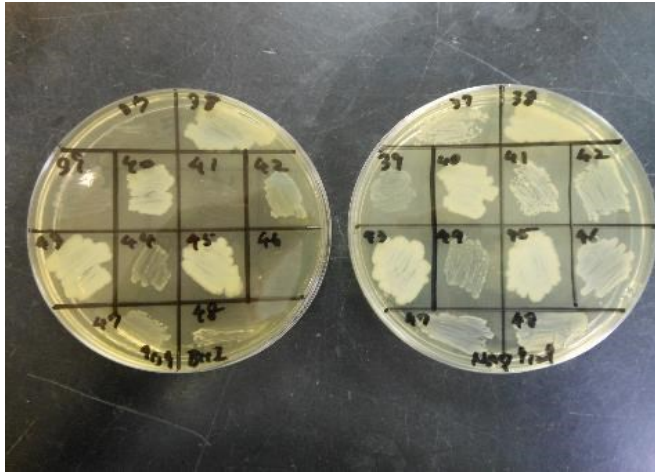
波形全体のパターン(≡構成されているタンパクの種類)から細菌同定。



Score value	判定結果
2.000.....3.000	菌種レベルの同定
0.000.....1.999	同定不能

# Appの検出と血清型別

肺、扁桃より菌培養、単離、純培養

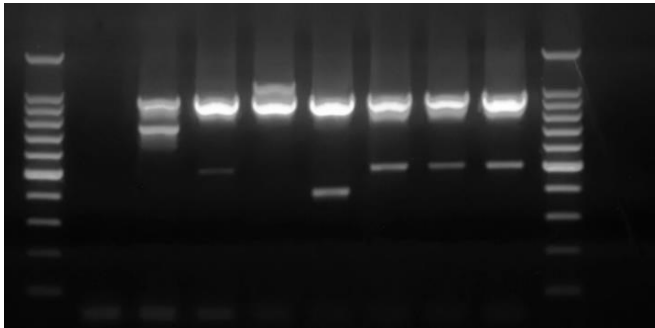


■ グラム染色

■ NAD要求性試験

■ 糖分解試験(マンニット・キシロース)

■ ウレアーゼ試験



マルチプレックスPCR

によるApp同定・血清型別

# PCRに用いたプライマー

name	target	product size(bp)
Ap1F	cps※1	750
Ap1R	cps※1	
Ap2F	cps※1	500
Ap2R	cps※1	
Ap5F	cps※1	1100
Ap5R	cps※1	
Ap7F	cps※1	400
Ap7R	cps※1	
Ap15F	cps※1	200
Ap15R	cps※1	
LPF F	omlA※2	950
LPF R	omlA※2	

※1 cps: 莢膜合成遺伝子

※2 omlA: 外膜リポタンパク合成遺伝子

# 統計解析

Fisherの正確確率検定を用い、各群の保有細菌比較を行った。

主成分分析により、各群および枝肉重量に関する保有細菌の特徴評価を実施した。

解析には統計解析ソフトRおよびGUI版であるEZRを用いた。

# 主成分分析の枝肉重量について

「**枝肉重量**÷**出荷日齢**」で一日増重量を算出。

全135頭の**平均値0.4058kg**を閾値とし、閾値より高値を「**1**」、低値を「**0**」として主成分分析に用いた。

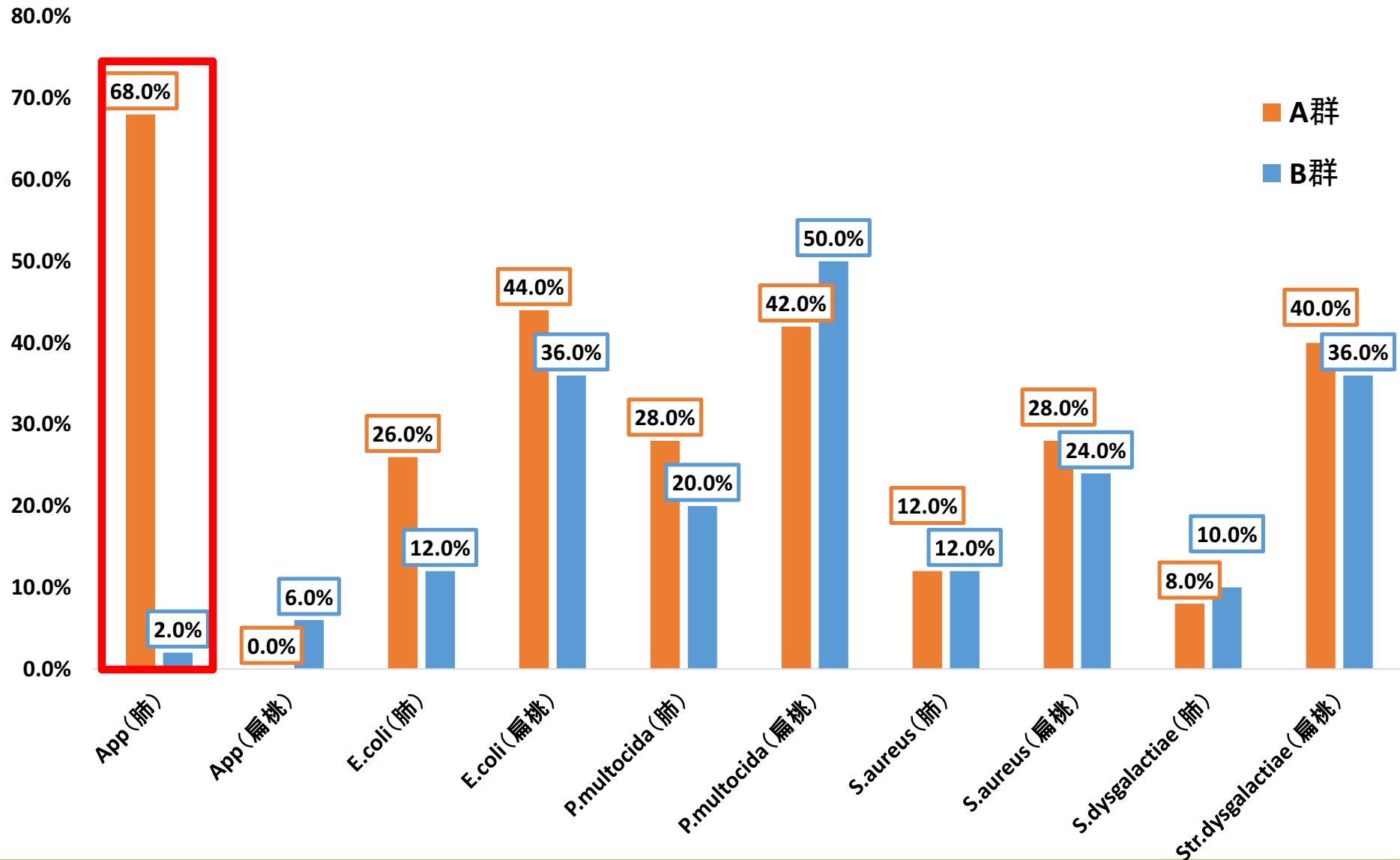
# 細菌の同定結果

1206菌株を解析し、32属菌を同定。

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App)
- *Escherichia coli*
- *Pasteurella multocida*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Streptococcus suis*

など。

# 感染率比較 (A群とB群)



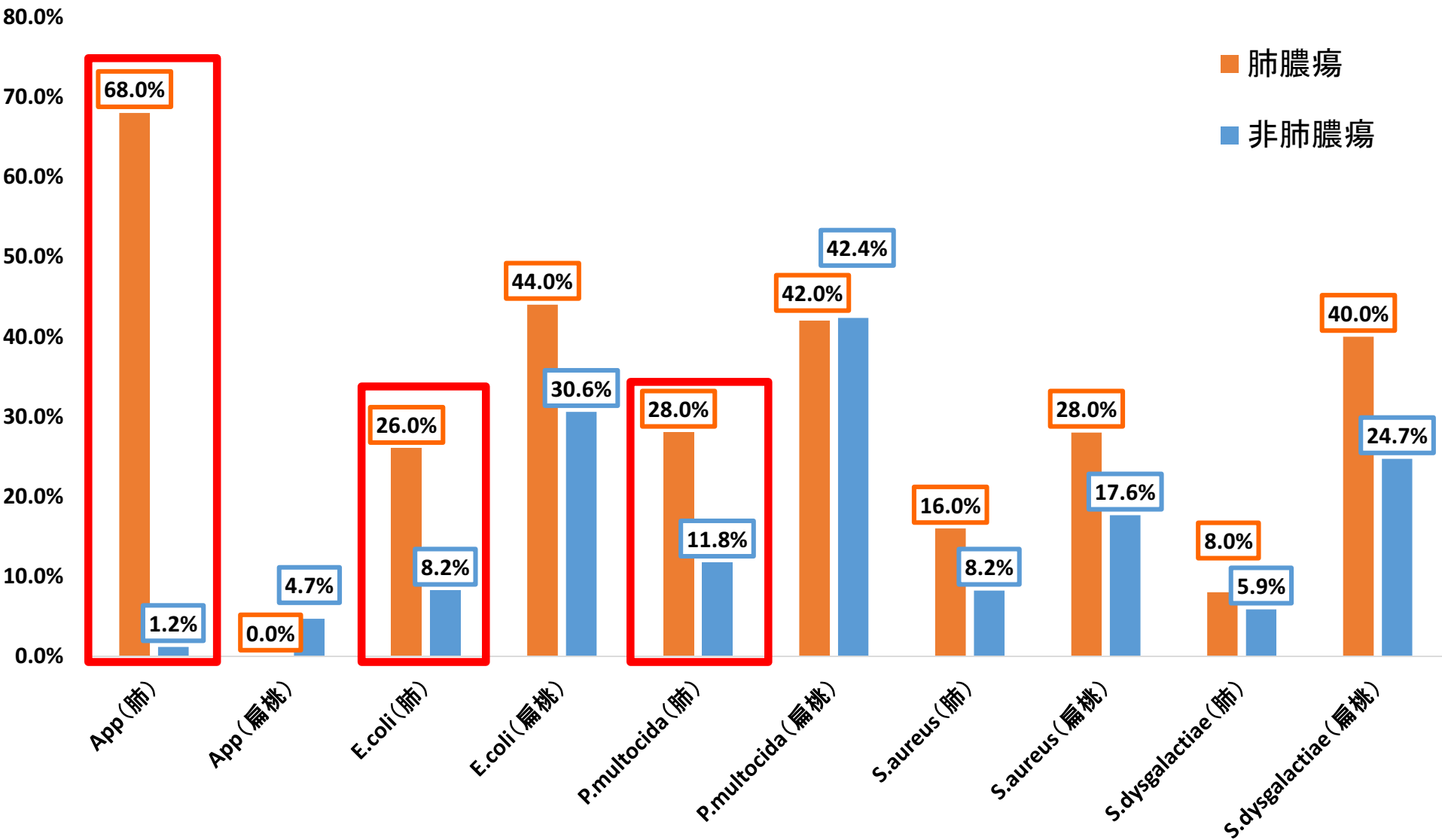
 : 感染頭数の有意差あり



A群

B+C群

# 感染率比較（肺膿瘍群と非肺膿瘍群）

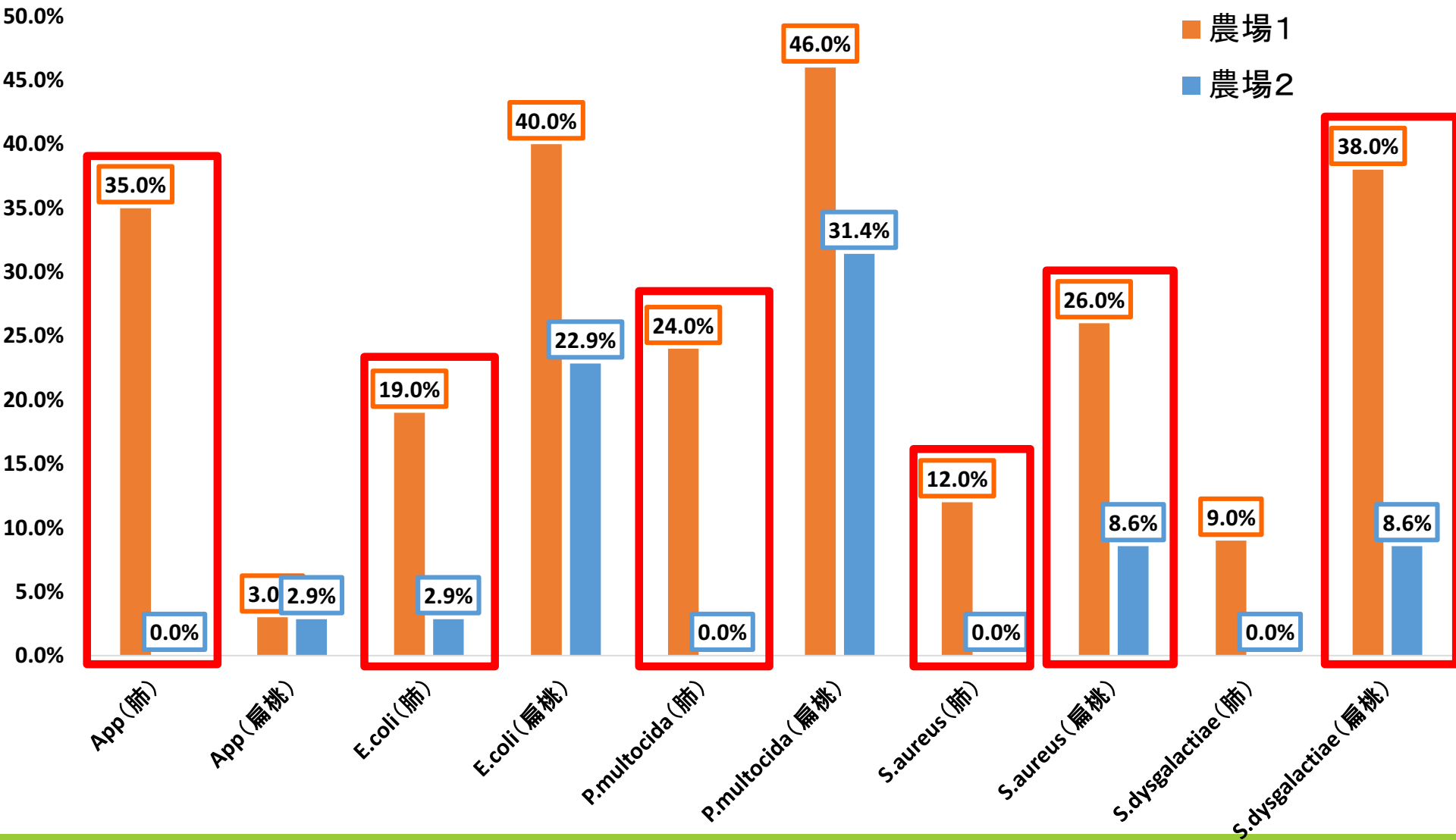


：感染頭数の有意差あり

# 感染率比較(農場1と農場2)

A+B群

C群



：感染頭数の有意差あり

# 同定結果のまとめ

		A群 (B群との比較)	膿瘍群 (非膿瘍群との比較)	農場1 (農場2との比較)
App	肺	高い	高い	高い
	扁桃	—	—	—
E.coli	肺	—	高い	高い
	扁桃	—	—	—
P.multocida	肺	—	高い	高い
	扁桃	—	—	—
S.aureus	肺	—	—	高い
	扁桃	—	—	高い
S.dysgalactiae	肺	—	—	—
	扁桃	—	—	高い

※「—」は有意差なし

# 同定結果のまとめ

A群  
(B群との比較)

膿瘍群  
(非膿瘍群との比較)

農場1  
(農場2との比較)

App

肺膿瘍形成の起因菌である可能性が高い。

E.coli

肺膿瘍形成に関与している可能性がある。

P.multocida

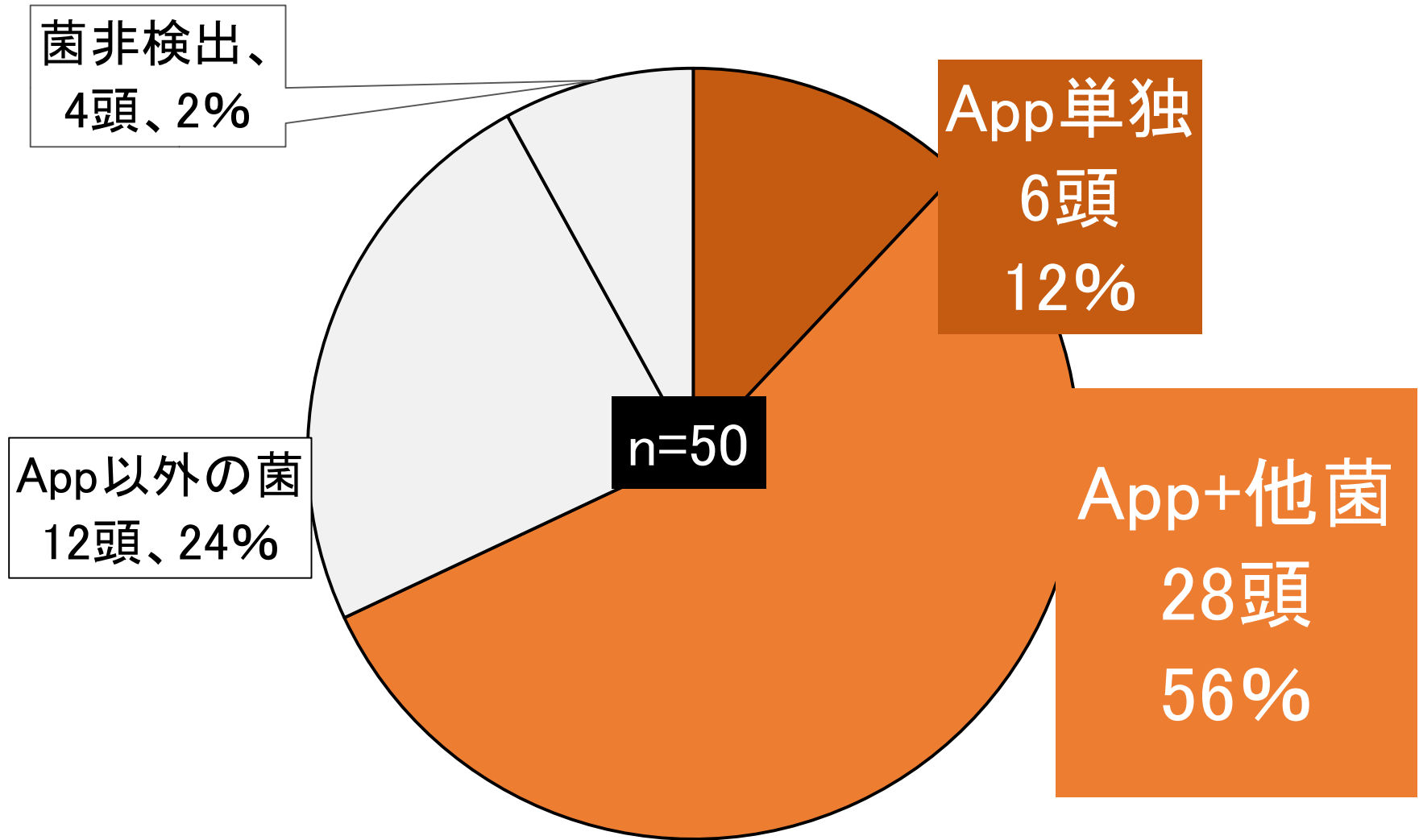
S.aureus

肺膿瘍形成に直接的に関与しない可能性が高い。  
ただし、肺の環境悪化等、間接的に関与する可能性はある。

S.dysgalactiae

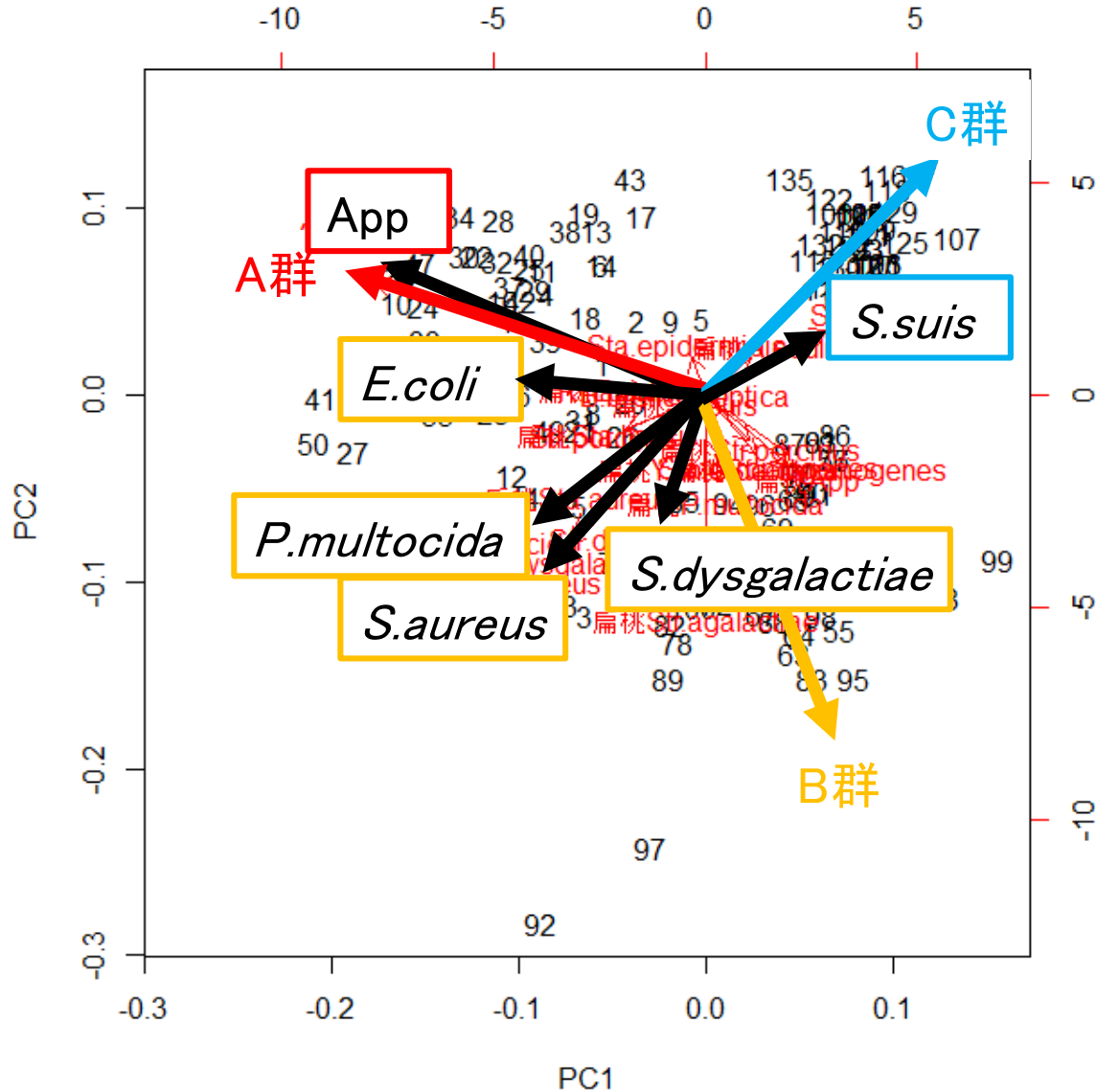
※「-」は有意差なし

# A群肺の感染内訳

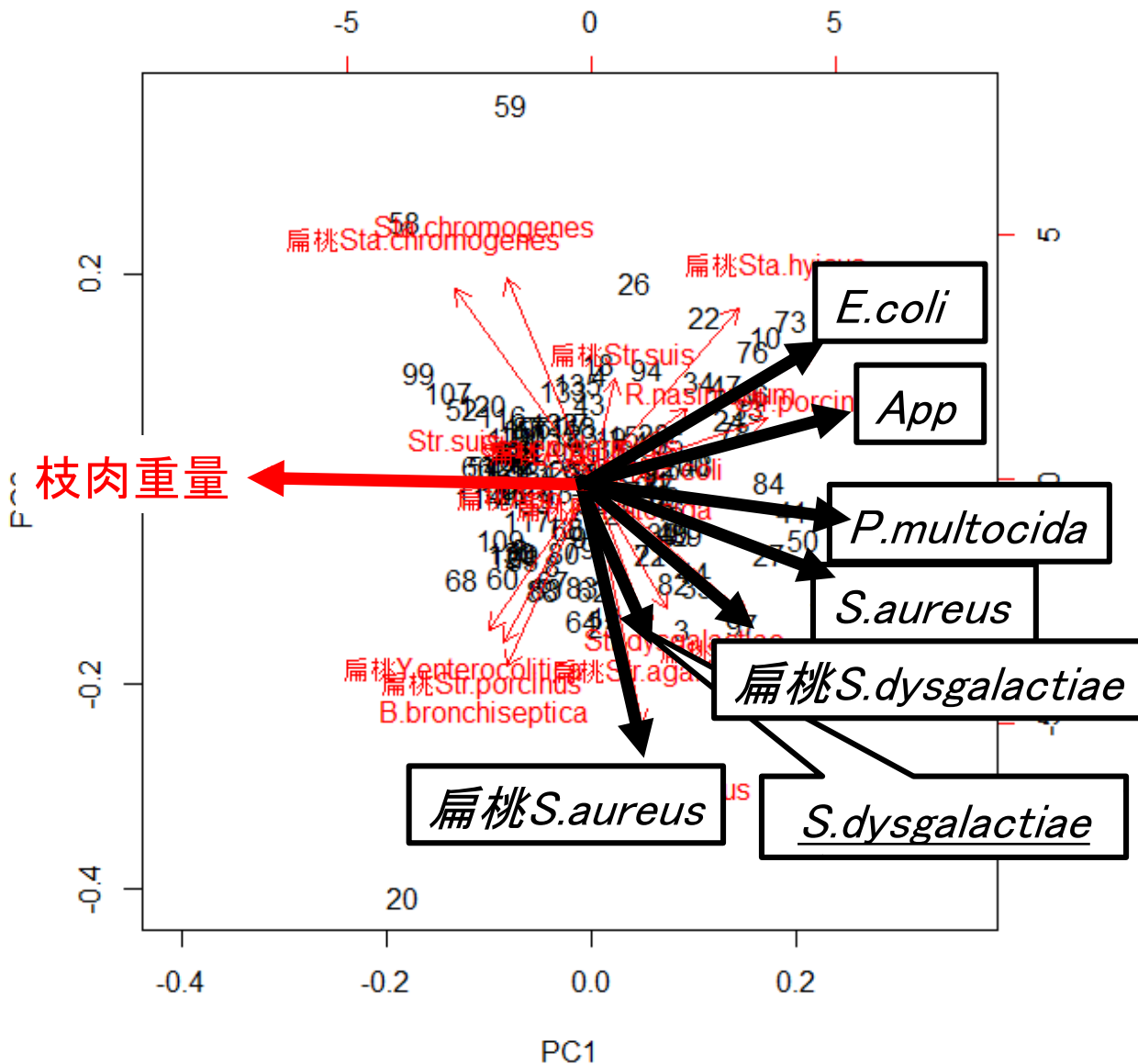


Appと他菌の複合感染が重要

# 3群における保有細菌の特徴



# 枝肉重量と保有細菌の特徴



# App同定および血清型の決定

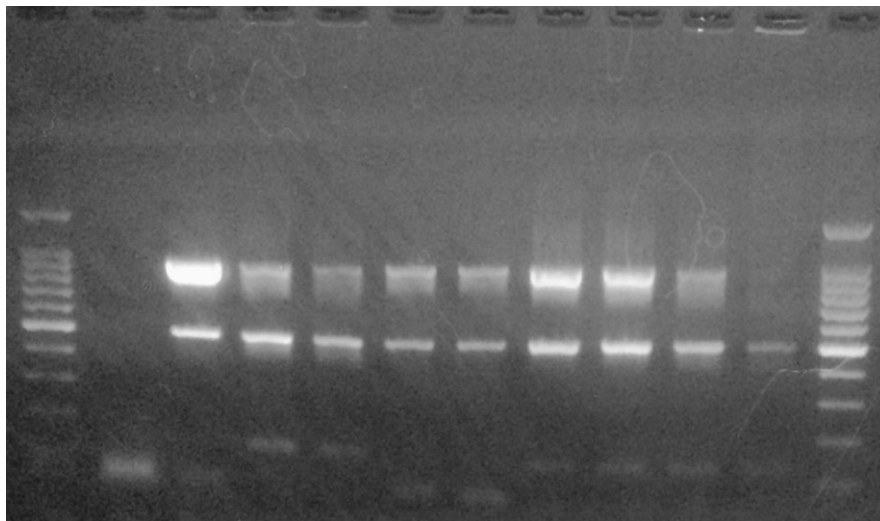
グラム染色	溶血性	NAD要求性	糖分解	ウレアーゼ
(-)小桿菌	完全溶血	+	+	+



AppマルチプレックスPCR実施



Appと同定した78菌株はすべて血清型2であった。



M N P

サンプル



# 考察

結果から、Appが肺膿瘍形成の最大の原因と予測される。

	Appワクチン接種	肺App陽性率	扁桃App陽性率
農場1	<u>70日、100日</u>	<u>35.0%</u>	3.0%
農場2	接種なし	0.0%	2.9%

扁桃のAppは農場間の差はない。

農場1において、Appのワクチンが効かない、かつ肺で増殖する要因が存在することが推察される。

# 考察

今回検出された *E.coli*、*P.multocida*、*S.aureus*、*S.dysgalactiae* はいずれもヒトの肺炎あるいは肺化膿症（肺膿瘍）の原因として知られている。

豚でも同様の疾病を起こす可能性が考えられる。

これら4菌種によって肺が障害されることにより、Appが増殖しやすい環境になるのか？

# おわりに

- 本研究は、北海道と学校法人酪農学園との包括連携協定に基づき、酪農学園大学と共同で実施した。
- 本研究実施にあたり、酪農学園大学の内田玲麻先生、村田亮先生、村松康和先生並びに中山大輔様には研究技術、結果解析で多大なるご助力を頂きました。感謝申し上げます。

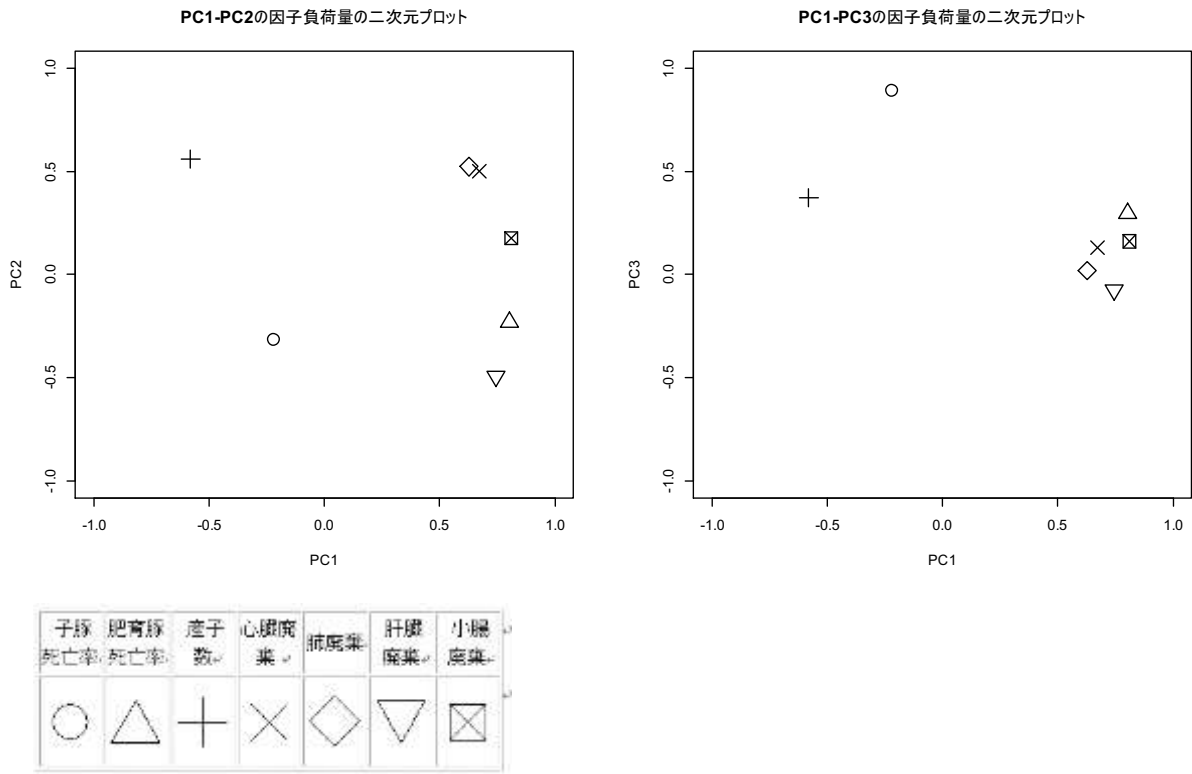
の縮約は、生産農場における衛生対策を考察する上でブレイクスルーとなりうるものであり、食肉検査データを縮約して農場の衛生レベルを表わす指標とし、行政の意思決定に利用することも考えられ得る。さらに本研究におけるターゲットだけではなく、種々の分野における多次元データ(アンケート結果など)を解析する上で有用な技法となり得ると考える。

【参考文献】

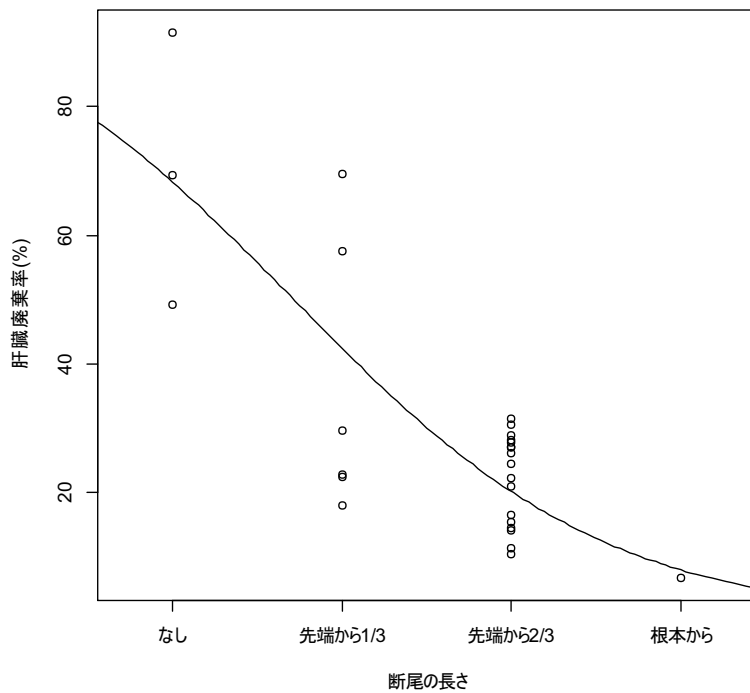
- [1] 森千恵子ら:と畜場で廃棄処分される肉用豚のいわゆる肝臓変性の調査とその発生防止対策,日獣会誌,40,183-189 (1987)
- [2] 足立泰基ら:季節自己回帰和分移動平均モデルによると畜検査データの時系列分析法,日獣会誌,68,189-197 (2015)
- [3] Adachi Y et al.: Real time detection of farm-level swine mycobacteriosis outbreak using time series modeling of the number of condemned intestines in abattoirs, J Vet Med Sci, 77, 1129-1136 (2015)
- [4] Scheidt AB et al.: The effect of all-in-all-out growing-finishing on the health of pigs, Swine Health Prod, 3, 202-205 (1995)
- [5] Kritas SK et al.: Relationships between tail biting in pigs and disease lesions and condemnations at slaughter, Vet Rec, 160, 149-152 (2007)
- [6] Teixeira et al.: Study on the association between tail lesion score, cold carcass weight, and viscera condemnations in slaughter pigs, Front Vet Sci, 3:24 (2016)
- [7] Nannoni E et al.: A review on its short- and long- term consequences and effectiveness in preventing tail biting, Ital J Anim Sci, 13, 98-106 (2014)
- [8] Tanaka Y et al.: A survey of reproductive performance and growth performance of pigs on commercial farrow-to-finish swine farms, J Vet Epidemiol, 11, 18-22, (2007)
- [9] Theodoropoulos G et al.: Farm-level factors associated with above-average production of pig farms in Evia ,Greece, Prev Vet Med, 89, 163-166 (2009)
- [10] Higgins R et al.: Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*, Can Vet J, 26, 86-89 (1985)
- [11] Maas A et al.: Use of An *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiple mutant as a vaccine that allows differentiation of vaccinated and infected animals, Infect Immun, 74, 4124-4132 (2006)
- [12] Fernandez PJ et al.: Atlas of transboundary animal diseases, OIE, Paris (2010)

第1表 生産者宛に送付した質問票の質問項目

飼育頭数・死亡頭数等	飼育方法	飼育舎	ワクチン
母豚飼育数、年間産子数、年間子豚死亡数、年間肥育豚死亡数、年間母豚更新数	出荷日齢、母豚の導入、育成豚の導入、馴致管理方式、初乳の分割給与、新生豚の歯切り、新生豚の断尾、離乳時期、放牧、駆虫剤投与、一群頭数	肥育舎の床材、換気、すきま風、オールイン・オールアウト、洗浄後の乾燥手順、飲用水の調達場所	オーエスキー病、PRRS、日本脳炎、パルボウイルス、TGE、PED、ゲタウイルス、豚丹毒、サーコウイルス、萎縮性鼻炎、大腸菌性下痢症、マイコプラズマ性肺炎、グレーサー病、インフルエンザ、ローソニア、ストレプトコッカス・スイス



第1図 PC1~PC3の因子負荷量の二次元プロット



第2図 GLMMモデルによる肝臓廃棄の有無と断尾の長さの回帰分析結果  
○: 各農場における肝臓廃棄率と断尾の長さ