

# 第9章 調査研究

## HPLC を用いた細胞壁脂質成分ミコール酸分析による 豚抗酸菌症の生化学的診断法の検討

橋倉さやか、柳瀬毅<sup>1)</sup>、原啓二<sup>2)</sup>、早船克己、西村一彦<sup>3)</sup>

1) 日高支庁、2) 中標津地域保健部（中標津保健所）、3) 道立衛生研究所

### 1 はじめに

豚抗酸菌症の原因菌である非定型抗酸菌は、細胞壁に高分子脂肪酸のミコール酸を含んでいる。ミコール酸は抗酸菌をはじめとする抗酸性細菌やその他類縁細菌に特有の細胞壁脂質成分で、これらの菌種の化学分類学的同定には極めて重要な項目であり、分析には GC、HPLC などが用いられる。

食肉検査の精密検査において、HPLC を用いて病変部分から菌体ミコール酸を検出することは、現在行っている抗酸菌染色による菌の検出や病理組織学的診断に加え、新たな診断法となりうると考えられる。HPLC による分析については、米疾病対策センター（CDC）により培養したコロニーを用いた方法が報告されている（CDC 分析法）。しかし、CDC 分析法は用いる有機溶媒や分析感度の点で検討が必要と考えられたため、今回これに改良を加え（改良法）、その有用性を検討した。さらに、改良法を用いて病変部分から直接菌体ミコール酸の検出を試み、食肉検査における豚抗酸菌症の診断法となりうるか検討を行った。

### 2 材料および方法

#### (1) 分析法の検討

移動相に用いる有機溶媒と脂肪酸分析用誘導体化試薬の 2 点について、CDC 分析法と改良法を比較検討した。材料には市販のミコール酸標準品（*M. tuberculosis* 由来）（Sigma、U. S. A.）と当所にて抗酸菌症の豚から分離同定した *M. avium* および *M. nonchromogenicum* を用いた。*M. avium* および *M. nonchromogenicum* についてはコロニーをアルカリ分解した後、誘導体化試薬によりエステル誘導体化し、HPLC 分析を行った。標準品については直接誘導体化を行った。

表1 移動相・グラジエント条件

#### (1) CDC 分析法

時間 (min)	0.0	1.0	20.0	20.5
ジクロロメタン (%)	2.0	20.0	65.0	2.0
メタノール (%)	98.0	80.0	35.0	98.0

#### (2) 改良法

時間 (min)	0.0	1.0	17.0	17.5
テトラヒドロフラン (%)	2.0	20.0	60.0	2.0
メタノール (%)	98.0	80.0	40.0	98.0

各分析法の移動相条件および誘導体化試薬については表 1、2 のとおり。その他の HPLC 条件は表 3 に示した。

## (2) 改良法を用いた豚抗酸菌症病変部分からの菌体ミコール酸の検出

材料には平成 16 年 3 月に当所管内と畜場で抗酸菌症として一部廃棄処分となった豚の腸間膜リンパ節を用いた。乾酪壊死巣 2.5g から Folch らの方法により全脂質を抽出し、アルカリ分解した。得られた脂肪酸から固相抽出カートリッジ (Sep-pak plus C18 cartridge (Waters, U. S. A.)) を用いて不要な脂肪酸を除去し、テトラヒドロフランでミコール酸を溶出、乾固し、ADAM 試薬により誘導体化後、HPLC 分析を行った。

## 3 成績

### (1) 分析法の検討

標準品、*M. avium*、*M. nonchromogenicum* のいずれにおいても改良法で CDC 分析法と同等の分離条件が得られた。標準品の濃度を変えて両誘導体の感度を比較したところ、ADAM 誘導体はフェナシル誘導体の約 200 分の 1 まで検出可能であり、誘導体として優れていることがわかった。さらに、改良法を用いて 4 頭の豚から分離した非定型抗酸菌のミコール酸を分析し、クロマトグラムのパターンを比較したところ、いずれも *M. avium* とほぼ似たパターンを示した。これら 4 菌株について DNA-DNA ハイブリダイゼーション法により同定を行った結果、すべて *M. avium* と同定された。また、*M. avium* を用いて改良法における定量性を検討したところ、菌数と検出面積の間に非常によい相関が認められ、検出限界は約  $2.4 \times 10^3$  個/ $\mu$ l であった。

### (2) 改良法を用いた豚抗酸菌症病変部分からの菌体ミコール酸の検出

豚抗酸菌症病変部分を直接分析したところ、保持時間 12~14 分の部分にミコール酸と思われる微量のピークが検出された。そこで検出に用いた病変部分から菌を分離し、そのミコール酸のパターンと比較したところ、前半部分は夾雑ピークが大きく分析が困難であったが、後半の 12~14 分のパターンは良い一致を示した。

表 2 脂肪酸分析用誘導体化試薬

#### (1) CDC 分析法

##### 臭化 *p*-ブロモフェナシル (*p*-Bromophenylacetyl bromide)

触媒：KHC<sub>3</sub>O<sub>3</sub>、クラウンエーテル

反応：アセトニトリル存在下で 100°C 20 分間

検出波長：UV254nm

#### (2) 改良法

##### ADAM (9-Anthryldiazomethane)

触媒：必要なし

反応：室温 1 時間

検出波長：Ex 365nm Em 412nm

表 3 HPLC 条件

装置	日立 L-7000 シリーズ
検出器	CDC 分析法：L-7455 型 UV 検出器 改良法：L-7485 型蛍光検出器
カラム	Mightysil RP-18GP (150×4.6mm、関東化学社製)
流速	2.5ml/min
カラム温度	35°C
注入量	20 $\mu$ l

#### 4 考察

CDC 分析法は培養したコロニーからミコール酸を抽出し、HPLC を用いて分析を行い、パターンをデータベース化したもので、これにより種レベルでの同定が可能となっている。しかし、CDC 分析法で移動相に用いるジクロロメタンは日本では排水基準があるため取り扱いが困難であり、また、誘導体化試薬臭化  $p$ -ブロモフェナシルは誘導体化に触媒や加熱の必要があるうえ、分析感度の面で微量のミコール酸を分析するには不相当と考えられ、これらの点について検討を行った。

ジクロロメタンと同等の極性を持ち、より実用的な有機溶媒テトラヒドロフランを移動相に採用した結果、改良法においても CDC 分析法と同等の分離が可能であることがわかった。誘導体化試薬に蛍光試薬 ADAM を用いたところ、フェナシル誘導体に比べ分析感度が 200 倍向上した。ADAM は誘導体化に触媒や加熱の必要がないため誘導体化を容易に行うことが可能であり、迅速性が要求される食肉検査の精密検査に用いるのによりふさわしいと考えられた。また、感度の優れた ADAM 誘導体を用いることで病変部分から微量ながらミコール酸のピークを検出することが可能となり、病変部分の直接分析による診断の可能性が示唆された。さらに、菌種による分離パターンの違いが確認されたことから、今後より多くの分析パターンデータの蓄積を行うことで、改良法を用いた抗酸菌同定が可能と考えられた。

以上のことから、改良法を用いた菌体ミコール酸の検出は食肉検査における豚抗酸菌症の診断法として有用であると考えられた。従来の細菌学的、病理学的診断に加え生化学的診断を行い、多方面からの精密検査が可能になることは、行政判断の信頼性向上につながると考えられる。

#### 【口頭発表】

- ・オホーツク支部獣医学術研究発表会
- ・日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会
- ・全国食肉衛生検査所協議会微生物部会
- ・食肉衛生技術研修会

#### 【雑誌投稿】

- ・北海道獣医師会雑誌平成 17 年第 49 巻第 1 号

## とちく場搬入豚におけるトキソプラズマ抗体調査

金子麻理、大内敏<sup>1)</sup>、小笠原徹<sup>2)</sup>

1) 富良野地域保健部（富良野保健所）、2) 早来食肉衛検

### 1 はじめに

近年、BSEや高病原性鳥インフルエンザなどの発生により消費者の食肉の安全に対する関心の高まりが見られる。当所では、昭和54年より所管する食肉処理場へ家畜を搬入する生産者に対し安全で安心な家畜生産の一助として、とちく検査における廃棄内容を提供するデータ還元事業を行ってきた。より安全で安心な食肉を提供するためには、個々の飼養形態に則したデータ還元が今まで以上に重要であると思われる。平成15年夏から秋にかけて豚の生産現場へ直接出向き生産者に対し衛生対策について聞き取り調査をおこなったところトキソプラズマ症に対する誤った認識が認められた。トキソプラズマ症は人獣共通感染症の一つで生産段階での予防が重要であり、また消費者のみならず生産者自身の健康にも関与する重要な問題である。このことから今回、とちく場搬入豚のトキソプラズマ抗体調査を行い、さらに生産者に対してアンケート調査を実施した。今回の抗体調査結果に加え、アンケート取りまとめ及びトキソプラズマ症のリーフレットを作成して生産者に情報を提供するという新たなデータ還元を試みたので、その結果を報告する。

### 2 材料及び方法

- (1) 調査期間：平成15年12月～平成16年1月
- (2) 対象生産者：当所所管の2つのとちく場に搬入した全ての豚生産者計70戸。採材は、一生産者につき肥育豚5頭、繁殖豚5頭を目標に実施。
- (3) 調査方法：とさつ直後の放血液から血清分離し、市販の診断キット（トキソチェックMT栄研）によるラテックス凝集反応で抗体価を測定した。採材頭数429頭、肥育豚（およそ6ヶ月齢）は343頭、繁殖豚（およそ36ヶ月齢）は86頭。
- (4) 判定：陽性 $\geq 1:64$  疑陽性 $= 1:32$  陰性 $< 1:32$
- (5) アンケート：「猫の飼育状況」と「トキソプラズマ症に関する生産者の理解度」についての2つの内容のアンケートを全生産者（70戸）に送付した。

### 3 成績

(1) 抗体調査結果：429頭中抗体陽性例は8頭（1.9%）、陽性例中抗体価64倍が2頭、128倍が5頭、256倍が1頭であった。肥育豚では、343頭中抗体陽性例は2頭（0.6%）で、抗体価64倍が1頭、128倍が1頭であった。繁殖豚では、86頭中抗体陽性例は6頭（7%）

	陽性	疑陽性	陰性
豚全体	8 (1.9%)	12 (2.8%)	409 (95.3%)
肥育豚	2 (0.6%)	5 (1.5%)	336 (98.0%)
繁殖豚	6 (7.0%)	7 (8.1%)	73 (84.9%)

で、抗体価 64 倍が 1 頭、128 倍が 4 頭、256 倍が 1 頭であった（表 1）。繁殖豚は肥育豚に比べて抗体陽性例が多かった。

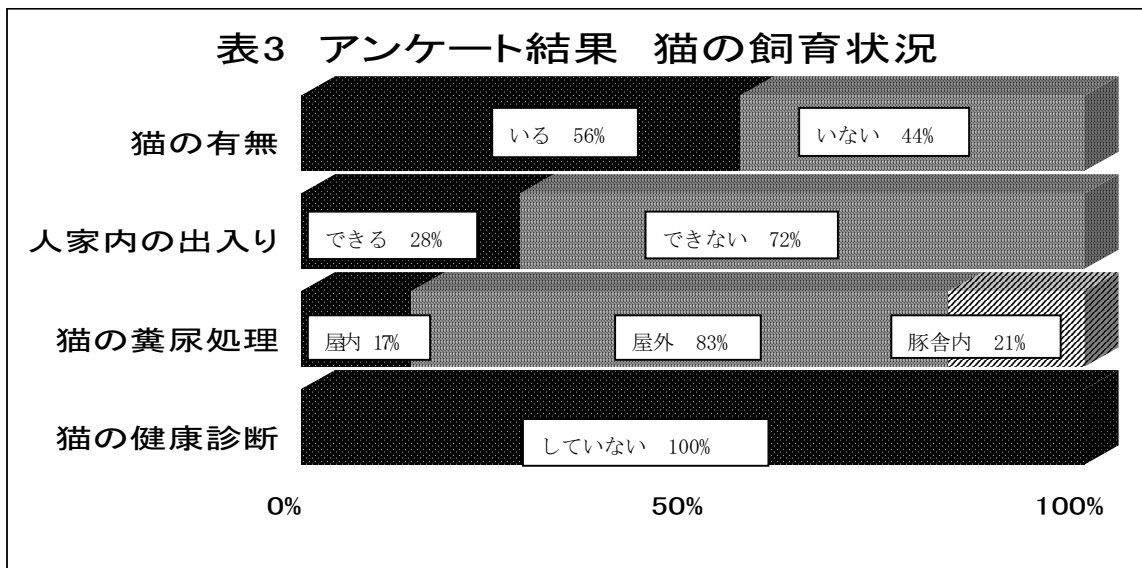
生産規模別で比較したところ平成 15 年度当所所管とちく場への年間搬入頭数が 1,000 頭未満の農家では、46 戸中 3 戸（6.5%）が抗体陽性を示した。年間 1,000 頭以上 3,000 頭未満の農家では 16 戸中 3 戸（18.7%）が抗体陽性を示した。これに

年間搬入頭数	戸数	陽性戸数	陽性率
1000 頭未満	46	3	6.5%
1000 頭以上 3000 頭未満	16	3	18.7%
3000 頭以上	8	0	0.0%

対して年間 3,000 頭以上の大規模生産者では、抗体陽性は認められなかった（表 2）。

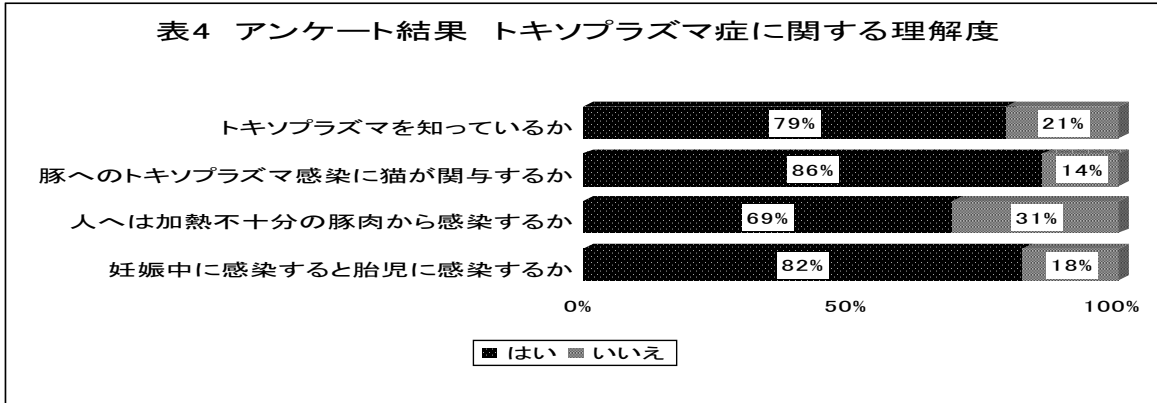
(2) アンケート結果（回答率約 57%）

猫の飼育状況：「猫はいるのか」という質問に約 56%が「豚の飼育環境中にいる」と回答しており、平均で野良猫が 5.5 匹、飼い猫が 2.1 匹いることがわかった。「それらの猫は人家内に侵入出来るか」という質問に「出来る」との回答が 28%あった。「猫はどこで糞尿しているか」の質問には、「家の中（屋内トイレ）」が約 17%、「屋外」が約 83%、「豚舎内」が 21%であった。「猫の定期的な健康診断を行っているか」に全員が「行っていない」と回答した（表 3）。



トキソプラズマ症に関する理解度：「トキソプラズマを知っているか」には、約 79%が「知っている」と回答した。「豚へのトキソプラズマの感染に猫が関与するか」は、正解率が 86%だった。「人へは加熱不十分の豚肉から感染するか」は、正解率が 69%、「妊娠中に感染すると胎児に感染するか」は、正解率が約 82%であった（表 4）。

表4 アンケート結果 トキソプラズマ症に関する理解度



#### 4 考察

抗体調査結果：今回の抗体調査で、全体の約2%の抗体陽性例を認めた。繁殖豚では、肥育豚に比べ抗体陽性例が多いことがわかった。このことから、飼育期間が長いためトキソプラズマの暴露機会が多くなると推測された。

アンケート調査：猫の飼育状況について質問した結果から、半数以上の生産者で豚の飼育環境中に猫が存在しており、猫の糞尿処理は豚舎内を含めてほとんどが屋外で行われ、また猫の健康診断については全生産者で実施していないことがわかった。トキソプラズマ症に関する理解度のアンケート結果では、ほとんどの生産者はトキソプラズマに関してある程度の知識を有しているが十分とは言えず、特に猫の糞尿処理について適切な対応を行っておらず、猫のトキソプラズマ感染に注意を払っていないことがわかった。

トキソプラズマ感染を排除するためには、豚舎の消毒や猫を飼育環境に近づけないなどの対策が必要とされている。今回、抗体調査の結果を個別に生産者に通知するとともにアンケートの取りまとめとトキソプラズマ症のリーフレットを送付した。

さらに当所管内の家畜保健衛生所に情報提供し、家畜保健衛生所から抗体陽性例の認められた生産者を指導することになった。このような疾病対策は、継続して実施することで、疾病排除が効果的効率的に行えると思われる。当所としては、この調査を継続し、生産者の指導にあたる方針である。今後もトキソプラズマ症やそれ以外の疾病についても的確な把握を行い、疾病データやリーフレットなどを活用し、生産者への正しい知識の普及等、効果的な情報提供を継続して実施することにより、安全で衛生的な食肉の提供に寄与していきたい。

#### 【口頭発表】

- ・オホーツク支部獣医学術研究発表会
- ・日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会
- ・全国食肉衛生検査所協議会北海道・東北ブロック大会

## 枝肉等拭き取り検査の大腸菌群数測定に用いる培地の検討

藤吉英邦、横井智、橋倉さやか、成澤昭徳、柳瀬毅<sup>1)</sup>、岡田聖恵、原啓二<sup>2)</sup>

1) 日高支庁、2) 中標津地域保健部（中標津保健所）

### 1 はじめに

現在、各とちく場では衛生管理の検証のため、日常業務として枝肉や施設の細菌検査を実施している。その際、大腸菌群数測定には以前よりデソキシコレート培地（デソ）が常用されている。しかし海外では、デソよりグラム陽性菌発育抑制因子を多く含むバイオレットレッド胆汁培地（VRB）が常用されている。また、わが国の水質検査では精度の点から、特定酵素基質法が適用されている。酵素基質を用いたトリコロール培地（トリコ）は、乳糖発酵で大腸菌群を検出するデソや VRB と異なり、特異酵素により検出するため、特異酵素を持つ非乳糖発酵菌も検出できる。今回、豚のと体拭き取り検体を試料とし、トリコを基準に他 2 つの培地の検出感度の差異を検証した。

### 2 材料および方法

平成 16 年 1 月から 3 月に、当所管内とちく場に搬入された豚のと体頸部を拭き取り、それを試料とした。拭き取った 210 検体をデソ、VRB およびトリコの 3 種類の培地を用い、1 cm<sup>2</sup> 当たりの大腸菌群数を測定し、比較検討した。トリコは大腸菌数も測定した。また、大腸菌株も同様に培養し、併せて検討した。

### 3 成績

3 種類の培地で大腸菌群数が 2~30 cfu / cm<sup>2</sup> だった 44 検体のデータ分析を行なった。トリコでの結果、大腸菌群の半数以上は大腸菌だった。3 種類の培地において、大腸菌群数の平均値に有意差は認められなかった。しかし、デソと VRB でトリコとの相関関係をみたところ、前者 (0.64) より後者 (0.83) の方が強い相関関係があることがわかった。また、大腸菌株を培養し、トリコの発育菌数を 1 とすると、デソで 0.55、VRB で 0.84 であった。

### 4 考察

トリコでの結果、今回の拭き取り検体の大腸菌群の半数以上は大腸菌が占めていることがわかった。大腸菌株を培養したところ、トリコと比べ VRB で 8 割、デソでは 5 割しか検出できなかった。このことから、トリコや VRB と比べ、デソでは糞便汚染を見逃す恐れがあることが示唆された。また、培地による大腸菌群数の平均値に有意差はなかったもののトリコは他 2 つの培地と比べ糞便汚染の指標となる大腸菌も容易に検出でき、精度面で優れている。なお、コスト面を考慮した場合、相関関係の強い VRB も推奨できると思われた。

#### 【口頭発表】

- ・オホーツク支部獣医学術研究発表会
- ・日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会

## 牛の心内膜腫瘍

成澤昭徳、谷山弘行<sup>1)</sup>

1) 酪農大獣医病理

症例：牛（ホルスタイン種）、去勢、1歳7ヶ月

臨床的事項：特になし

肉眼所見：左心室乳頭筋部に鶏卵大の灰白色腫瘍を一つ認めた。腫瘍の表面は平滑で、房室弁の腱索を巻き込んでいた(写真1)。断面は不規則に分葉し、出血巣、黄色巣、白色巣などまだら模様を呈していた。腫瘍と心筋の境界は比較的明瞭であった。他臓器に同様の腫瘍は認めなかった。

病理組織所見：腫瘍組織は束状に増殖した長紡錘形細胞が様々に交錯する充実性増殖領域と、大小の拡張した血管腔が多数形成される血管腫様領域より成っていた。充実性増殖領域には、馬蹄形または類円形の核と蛸足状に伸びる細胞質を有する巨大細胞が多数混在していた。また同細胞が血管腔を内張りする像や、蛸足状に伸びた細胞質が少量の赤血球を取り囲む像を散見した(写真2)。腫瘍組織と心筋境界部の膠原線維は疎で、腫瘍細胞は心筋組織内に軽度に浸潤していた。免疫染色で腫瘍組織はビメンチンに一樣に陽性を示した。中でも紡錘形細胞はデスミンや平滑筋アクチンに広く陽性を示し、巨大細胞はFactor VIIIに陽性を示すものを散見した(写真3)。

診断名：牛の心臓血管筋腫

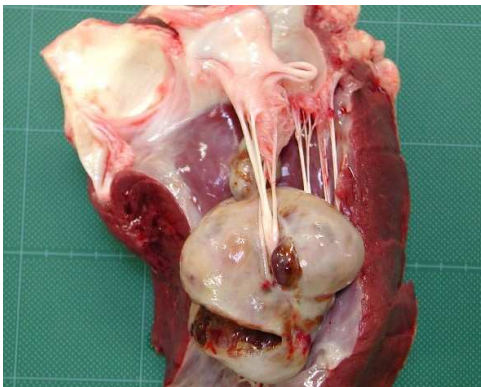


写真1 左心室乳頭筋部の鶏卵大灰白色腫瘍

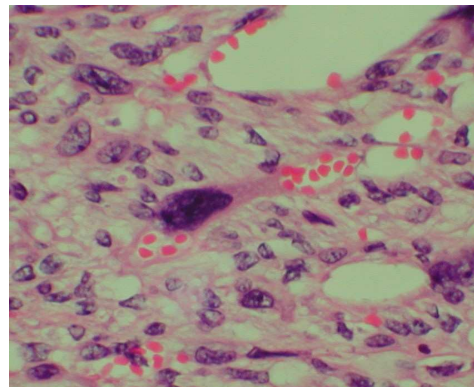


写真2 赤血球を取り囲む巨大細胞の蛸足状細胞質

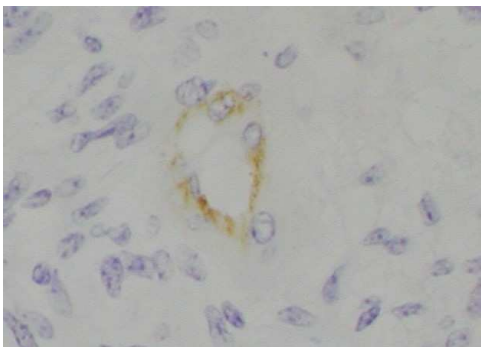


写真3 Factor VIIIに陽性を示した巨大細胞

【口頭発表】

・全国食肉衛生検査所協議会病理部会



## 鶏の皮膚

久田裕子

獣畜：鶏 品種：不明 性別：不明 日齢：52日齢

生体検査所見：ロット毎の検査のため確認できず。

解体検査所見：胸腹部、背部および脚部の皮膚に直径5mm程の黄白色の結節を多数認めた。

結節には中心部が陥没しクレーター状になっているものも多く認められた。その他、諸臓器、筋肉に肉眼的な異常は認められなかった。

病理組織所見：表皮は脱羽処理により一部を除き欠損していた。真皮に大型で類円形の明るい核を持ち、好酸性の広い細胞質を有する腫瘍細胞が弧在あるいは集簇として認められた。腫瘍細胞が層状に集簇した部位の中心には癌真珠も散見された（写真）。また、線維性結合織が増生し、リンパ球、偽好酸球を中心とした炎症細胞の浸潤が認められた。

診断名：皮膚（真皮）の扁平上皮癌

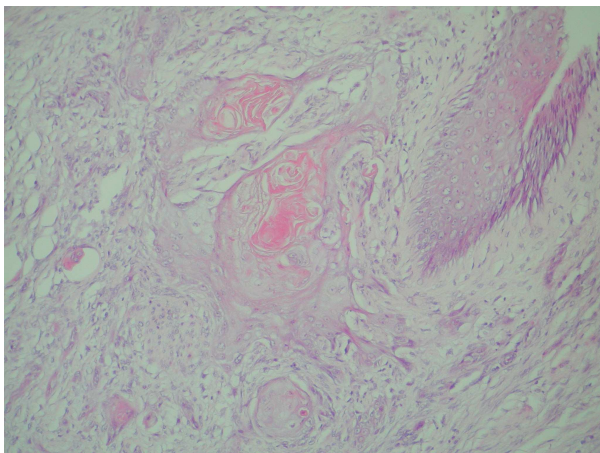


写真 真皮に腫瘍細胞が集簇し、中心に癌真珠を認める。

・平成16年度食肉・食鳥肉病理症例検討会提出標本