

雨水マスにおける蚊幼虫・サナギの発生状況調査 (平成 25 年)

微生物門

○伊藤隆起, 池永充宏

1 目的

近年, ウエストナイル熱, デング熱, チクングニヤ熱などの日本上陸が懸念されている。これらのウイルスの最も有力な媒介者は京都市内でもごく普通にみられるアカイエカとヒトスジシマカであり, その主な発生源の一つは道路脇の雨水マスである。そこで, 雨水マスにおける蚊幼虫・サナギの発生状況を把握し, 蚊防除対策の基礎資料とするため調査を実施した。なお, この調査は前年度からの継続調査である。

2 方法

平成 25 年 4 月 4 日から 12 月 26 日まで, 毎週 1 回, 衛生環境研究所前の道路脇の雨水マス 3 箇所 (地点No.1~3) から, マス内の停留水を特定の柄杓 (直径 13cm, 深さ 7cm) で採水し, 蚊幼虫・サナギの種類を鑑別し計数した。なお, サナギは置き水で飼育し, 成虫に羽化させて種類を鑑別した。

3 結果

採集結果を表 1 に示す。

全期間を通じて合計 2,433 個体の幼虫・サナギを採集した。種類はほとんどがアカイエカ群とヒトスジシマカの 2 種で, 比率をみると 3 地点ともアカイエカ群が多く, 地点No.1 が 70%, 地点No.2 が 72%, 地点No.3 が 69%であった。その他の種はヤマトヤブカが 2 個体採集されただけであった。

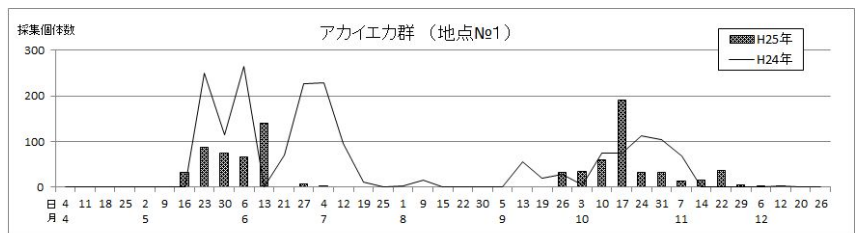
表 1 地点別採集成績

地点	アカイエカ群			ヒトスジシマカ		
	幼虫	サナギ	計	幼虫	サナギ	計
No.1	815	71	886	339	32	371
No.2	317	51	368	123	22	145
No.3	380	78	458	180	25	205
計	1,512	200	1,712	642	79	721

採集数が最も多かった地点No.1 の採集日別結果を前年 (平成 24 年) の成績とともに図 1 に示す。

(1) アカイエカ群の季節的消長

最初の出現は 5 月 16 日で, その 4 週間後の 6 月 13 日に 1 回目のピークが見られたものの, その次の週は採集 0 個体となった。これは台風による大雨の影響と思われ, そのまま復活することなく 7 月 8 日にはまったく採集されなかった。次に現れたのが 9 月 13 日で, その後徐々に増加し 10 月 17 日に 2 回目のピークをみせた後再び激減し, 最後に採集されたのは 12 月 12 日のサナギ 4 個体であった。前年の成績と比較すると, ピークに 1~2 週のずれはあるものの, 明確な二峰性の発生消長がみられた。



(2) ヒトスジシマカの季節的消長

最初の出現は 4 月 11 日で, その翌週の 4 月 18 日に 1 回目のピークが見られたものの, その後急速に減少し, 6 月 27 日と 8 月 15 日及び 8 月 30 日に散発的に多く採集され。最後に採集されたのは昨年より約 1 箇月遅い 11 月 14 日であった。

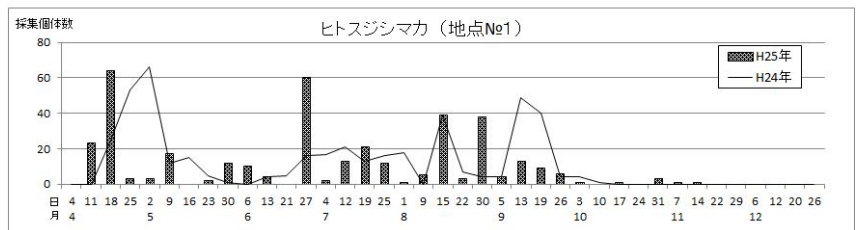


図 1 地点No.1 の採集日別成績

4 考察

今回の調査結果と昨年の結果をみると, アカイエカ群とヒトスジシマカのそれぞれの発生時期やピークがほぼ一致していることが認められた。また, 他のマス (No.2, No.3) においても同じ傾向がみられたことから, 当地域の雨水マスでの発

生パターンを把握できたと思われる。今後は他の地域で行われた雨水マス調査との比較や、蚊成虫生息調査等との照合を重ね、京都市における蚊類の生息状況の把握に努めたい。

京都市におけるマダニの生息調査について (Ⅲ)

微生物部門

○西野 康子, 伊藤 隆起, 池永 充宏

1 目的

平成 23 年度から刺咬障害や感染症を引き起こすマダニの京都市内における生息状況を調査している。平成 23 年度, 24 年度の調査結果から市内周辺部には多種多数のマダニが生息しており, その遺伝子検査の結果からリケッチアを保有すると思われる個体が多いことが明らかになった。

平成 25 年度は, 北区氷室地区の継続調査を実施し, 同地区での平成 23 年度及び 24 年度の結果と, 捕獲ダニの種類, 発育期, 陽性率等を変化がないか比較した。

2 方法

前年度と同様にフランネル布を用いた flagging 法により, 1 ポイント当たり概ね 30 分間採集した。採集したマダニは生きたまま持ち帰り, 体液を採取した後にプレパラートを作成し鑑別を行った。体液は MACHEREY-MAGEL 社の NucleoSpin Blood QuickPure を用いて DNA を抽出し, 17-kDa 蛋白遺伝子を増幅するプライマー-R1/R2 及び *R. japonica* に特異的なプライマー-Rj5/Rj10 による nested-PCR を行った。

3 結果

平成 25 年度に採集したマダニは 127 匹でフタトゲチマダニ, キチマダニ, ヒゲナガチマダニ, タカサゴキララマダニの 4 種類であり, その大半はフタトゲチマダニの若ダニであった。

平成 23 年度~25 年に採集したマダニ総数は 616 匹であり, その比率は図 1 の通りであった。また各年度の採集マダニの種類比を図 2~図 4 に示した。各年度とも 4 種類であり, その比率は何れの年度もフタトゲチマダニが約 9 割を占めていた。

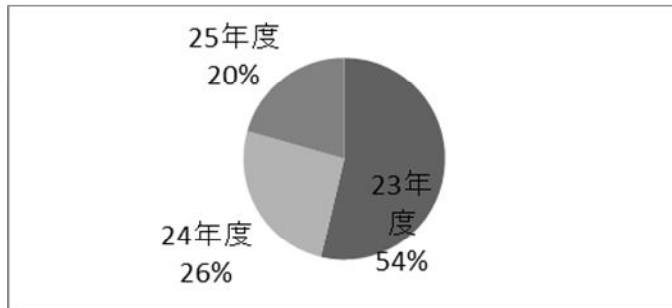


図1 年度別採集比率 (採集総数は616匹)

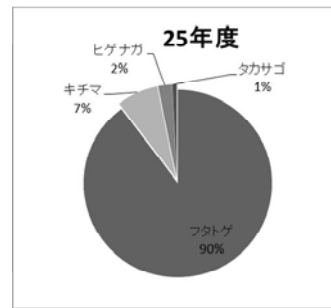


図2

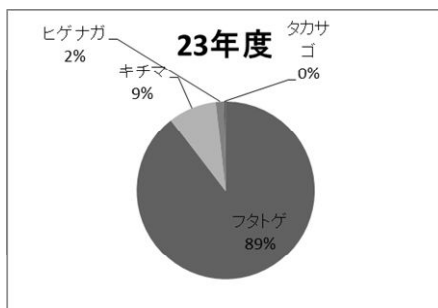


図3

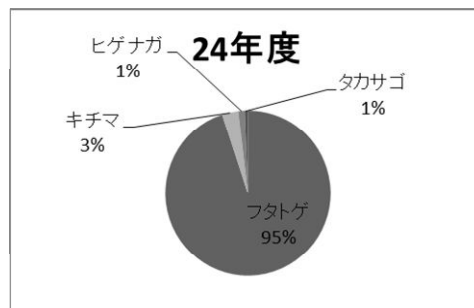


図4

図5で示す通り採集したフタトゲチマダニの遺伝子検査で, 病原体を保有する可能性が高いことが判明した。各年度とも8割以上の高い陽性率をしめしていた。

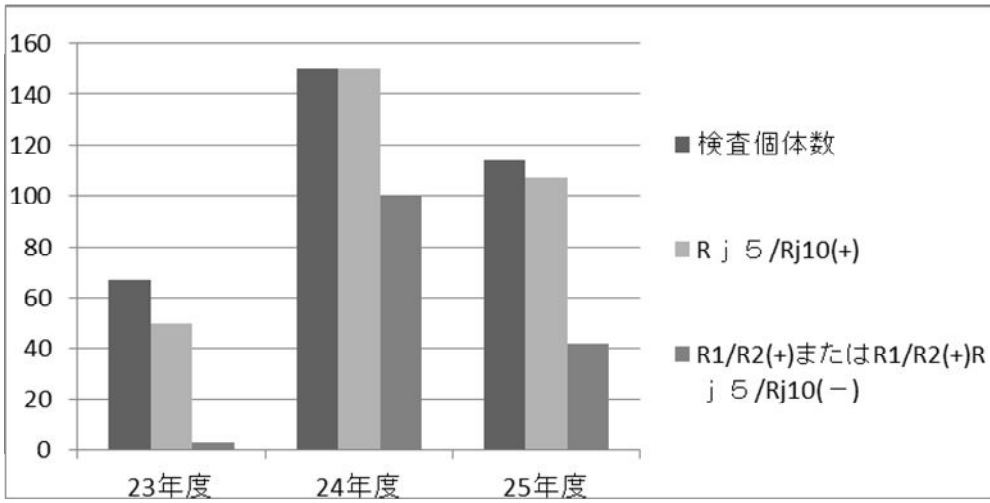


図5 フタトゲチマダニの陽性率

4 考察

平成 25 年度の採集場所は山中ではあるが、マダニは小動物などに運ばれ移動することから、山に近い公園等にも生息している可能性がある。野生動物の目撃情報のある公園や、ダニ被害情報のある民家周辺などを中心にさらに調査を行い、生息が確認された場合は、市民啓発等を行う必要があると考えられる。

京都市における蚊の病原体保有調査

微生物部門

○杉江 真理子 (中京区役所保健部), 渡辺 正義

1 目的

デングウイルスは、近年日本で検査の需要が高まっている節足動物媒介性(アルボ)ウイルスである。媒介蚊は主にネッタイシマカやヒトスジシマカで、患者発生国ではヒト-蚊-ヒトのサイクルで伝播し、都市部で流行を引き起こしている。3~10日間の潜伏期の後に、全身の不快感、倦怠感といった前駆的症狀があり、突然の発熱、頭痛、全身の筋肉痛がほぼ同時に出現する。発熱は二峰性であることが多いが、約1週間で解熱する。デング熱は、自然治癒傾向の強い疾患であるが、血小板減少による出血症状を伴ったデング出血熱にまで移行することがあり、さらにデングショック症候群まで進行した場合、適切な治療を施さないとショック死する危険性もある。デング熱にはワクチン及び特効薬がなく、予防としては、いかに感染蚊から身を守るか、感染蚊を増やさないかが焦点となる。

そこで、媒介蚊における、デングウイルスの保有状況を早期に探知することを目的に、京都市内で捕集したヒトスジシマカのメスを使用し、ウイルスの遺伝子検出を行った。

2 方法

捕集したヒトスジシマカのメス約20匹を1プールとして、BPA加イーグルMEM培地中で粉碎後、遠心分離した上清を検液とした。検液からRNAを抽出し、デングウイルスの遺伝子検出を国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従い実施した。

3 結果

京都市衛生環境研究所捕集682匹、北HC捕集59匹、上京HC捕集9匹、左京HC捕集14匹、中京HC捕集41匹、東山HC捕集8匹、山科HC捕集1匹、下京HC捕集8匹、南HC捕集118匹、右京HC捕集9匹、西京HC捕集40匹、伏見HC捕集8匹、計997匹(60プール)について検査した結果、デングウイルスは、全て陰性であった。

4 考察

京都市では、海外からの観光客数が増加しており、日本国内でのデング熱の輸入症例は増加している。また、デングウイルスは、ヒトに感染した場合、かなりの割合で不顕性感染に終わると考えられており、デング熱を発症した場合においても、潜伏期間中に検疫を通過することが容易に起こり得るため、実際の届出数以上に潜在的な患者及び病原体保有者が存在することが推測される。海外では、これまで国内発生の報告がなかった国においても、2010年にフランスでデング熱の国内発生が報告されており、日本においても注意が必要と考えられる。

今回の結果では、デングウイルスは検出されなかったが、流行の危険性は年々高まっており、定期的なサーベイランスが重要である。

鴨川のカモにおけるインフルエンザウイルスの保有状況

微生物部門

○渡辺 正義、杉江 真理子（中京区役所保健部）

1 目的

インフルエンザウイルスは変異しやすく、平成21年に発生した新型インフルエンザ（AH1pdm）のように、しばしば大流行を引き起こす。

カモはインフルエンザウイルスの宿主であり、A型インフルエンザウイルスの全ての亜型（HA16型、NA9型）を保有している。また、カモは渡り鳥であり、インフルエンザウイルスの「運び屋」として注目されている。

そこで、鴨川に飛来するカモの糞を採取し、インフルエンザウイルスの保有状況を調査した。

なお、本調査研究は京都産業大学との共同研究である。

2 方法

平成25年12月から平成26年3月まで、鴨川河畔（丸太町橋から北山大橋間）にてカモの糞を採取した。

検査は、実験施設が当研究所に無いため、京都産業大学において実施し、孵化鶏卵法によるウイルス分離（及び同定）を行った。

3 結果

平成25年12月2日から平成26年3月25日まで（計13回）、鴨川河畔（荒神橋から北山大橋間）にてカモの糞を採取した。

採取した337検体は、孵化鶏卵法でインフルエンザウイルスの分離を試みたが、インフルエンザウイルスは分離されなかった。

4 考察

本シーズンの調査において、カモ糞便からインフルエンザウイルスは分離されなかった。一方、環境省が実施している野鳥における定期糞便検査の結果によると、平成24-25年シーズンは約13000検体から27検体の低病原性鳥インフルエンザウイルスが分離されている¹⁾。今シーズンの京都市における調査では検出されなかったが、全国的な調査結果を勘案すると、定期的な調査をすることが重要と考えられる。

中国ではトリインフルエンザウイルスA（H7N9）のヒトへの感染が報告されており²⁾、インフルエンザウイルスの動向は、常に監視の必要があるといえる。

5 参考文献等

1) 平成24-25年シーズンの野鳥における鳥インフルエンザウイルス保有状況調査の結果について：

環境省自然環境局鳥獣保護業務室：平成25年9月6日

2) WHO ホームページ 「Avian influenza A(H7N9) virus」

ブタにおけるインフルエンザウイルスの保有状況

微生物部門

○渡辺 正義, 杉江 真理子 (中京区役所保健部)

1 目的

平成 21 年に発生した新型インフルエンザ (AH1pdm09) のように、インフルエンザウイルスは変異しやすく、トリ型由来のパンデミックが世界的に危惧されている。

ブタはヒトインフルエンザとトリインフルエンザの両方に感受性があり、遺伝子再集合によって、新型インフルエンザウイルスが発生する可能性がある。

そこで本研究では、ブタの鼻腔ぬぐい液よりインフルエンザウイルスを分離し、その解析を行うことを目的とした。

なお、本調査研究は京都産業大学との共同研究である。

2 方法

食肉検査部門に依頼し、京都市と畜場に搬入されたブタから、鼻腔ぬぐい液を採取した。

調査期間は、ヒトにおけるインフルエンザ流行シーズンと想定した平成 25 年 12 月から平成 26 年 3 月までとし、期間中週 1 回、各 10 検体を採取した。

採取した鼻腔ぬぐい液を液体培地に懸濁後、ろ過滅菌し、ろ液を MDCK 細胞に接種し 1 週間培養を 2 回行い (盲継代 2 代)、CPE を観察した。

ヒトに感染する可能性があるインフルエンザウイルスが分離された場合は、リアルタイム RT-PCR 法により同定 (AH5, AH3 及び AH1pdm) した。詳細な解析は、京都産業大学に依頼することとした。

3 結果

平成 25 年 12 月 3 日から平成 26 年 3 月 25 日の間 (計 14 回)、食肉検査部門に依頼し、ブタ鼻腔ぬぐい液 140 検体を採取した。検体を MDCK 細胞に接種したところ、3 検体からインフルエンザウイルス (AH1pdm) を分離した。

4 考察 (結論及び評価)

本調査ではインフルエンザウイルス (AH1pdm) が分離された。IASR の速報¹⁾によると 2013/14 シーズンはインフルエンザウイルス (AH1pdm) の分離・検出が多く報告されているため、ブタからのウイルス分離はヒトでの流行を反映している可能性が考えられる。本研究で分離されたインフルエンザウイルスは京都産業大学に詳細な解析を依頼する予定である。

アメリカではブタインフルエンザウイルス (AH3N2v)²⁾、中国ではトリインフルエンザウイルス (AH7N9) のヒトへの感染が報告されており³⁾、インフルエンザウイルスの動向は、常に監視の必要があるといえる。

5 参考文献等

- 1) 国立感染症研究所ホームページ「IASR インフルエンザウイルス分離・検出速報 2013/14 シーズン」
- 2) CDC ホームページ「Information on Influenza A (H3N2) Variant Viruses (「H3N2v」)」
- 3) WHO ホームページ「Avian influenza A(H7N9) virus」

生食用食肉検査法についての一考察

微生物部門

○西中 麻里子, 永田 有希, 松本 剛芳, 橋本 貴弘

1 目的

生食用食肉は規格基準で腸内細菌科菌群が陰性であることとなっているが、腸内細菌科菌群は環境中に広く分布している。そのため、当研究所で検査を新たに始めるにあたり、環境中からの影響を避け、適正に生食用食肉の検査が実施できるよう検査環境を整えるため、検査における環境からの影響等について調査検討を行った。

2 方法

(1) 検体搬入時の外部環境の影響

検体搬入容器内の温度変化について、検体搬入用容器内に保冷剤と検体を入れたもの及び氷水中に密封した検体を入れたものを用意し、屋外の日陰に設置して容器内の温度変化を経時的に記録し、比較した。

次に、検体搬入容器の汚染状況について、生食用食肉の取去時に3カ所の保健センターが検体搬入に使用した搬送容器内の側面及び底、検体の包装表面を滅菌生理食塩水で湿らせた滅菌綿棒でふき取りを行い、ふき取り液をVRBG培地に接種し、腸内細菌科菌群の検出状況を調査した。

(2) 生食用食肉の検査中の影響

牛肉を高圧蒸気滅菌し、無菌にした模擬陰性生食用食肉（以下Aとする）と、牛肉表面に*E. coli*を約 10^5 CFU添加した模擬陽性生食用食肉（以下Bとする）を作成し、通知法に基づいて検査した際の検査環境の腸内細菌科菌群による汚染度を調査した。

ア 模擬陰性検体及び模擬陽性検体の検査

Aを2個用意し、クリーンベンチの中と外でそれぞれ切分け処理を行った。Bについてはクリーンベンチの外でのみ切分け処理を行い、通知法に基づきそれぞれ検査を行った。

イ 模擬陽性検体検査時における器具の汚染状況の検討

Bの切分け処理時に使用した包丁及びトレイ、使い捨て手袋を滅菌生理食塩水で湿らせた滅菌綿棒でふき取り、ふき取り液をVRBG培地に接種して腸内細菌科菌群の検出状況を調査した。

ウ 検査環境からの汚染状況の検討

上記の(2)アの検査を行っている間、作業場所の数カ所にシャーレのふたを開けたVRBG培地を設置し、環境中の腸内細菌科菌群の検出状況を調査した。

(3) 生食用食肉中の腸内細菌科菌群の検査

市内流通しているブロック状の生食用食肉3検体をクリーンベンチ外で切分け、通知法に基づき検査を行った。

3 結果

(1) 検体搬入時の外部環境の影響

検体搬入容器内の温度変化では、保冷剤使用時は経時的に容器内温度が上昇したが、氷水を使用した場合は4時間後でも容器内温度が一定に保たれていた。(図1)

また、検体搬入容器の汚染状況においては、容器内及び検体包装表面のいずれも腸内細菌科菌群は検出されなかった。(表1)

(2) 生食用食肉の検査中の影響

模擬陰性検体及び模擬陽性検体の検査では、模擬陰性検体をクリーンベンチの中または外で処理をした検体のいずれも腸内細菌科菌群が陰性であった。また、模擬陽性検体はすべて腸内細菌科菌群が陽性であることが確認できた。(表2)

次に、模擬陽性検体検査時における器具の汚染状況について調べたところ、切分け処理に使用した包丁及びトレイ、使い捨て手袋のすべてから腸内細菌科菌群が検出された。(表1)

また、検査環境からの汚染状況について、模擬陰性検体及び模擬陽性検体の検査時の環境中の腸内細菌科菌群はすべての場所から検出されなかった。(表1)

(3) 生食用食肉の腸内細菌科菌群の検査

3検体とも25g中の腸内細菌科菌群が陰性であった。(表2)

表1 腸内細菌科菌群のふき取り検査結果

ふきとり場所	結果
保健センターA 搬送容器内 底	陰性
保健センターA 搬送容器内 側面	陰性
保健センターA 検体(生肉)外面	陰性
保健センターB 搬送容器内 底	陰性
保健センターB 搬送容器内 側面	陰性
保健センターB 検体(生肉)1外面	陰性
保健センターB 検体(生肉)2外面	陰性
保健センターC 搬送容器内 底	陰性
保健センターC 搬送容器内 側面	陰性
保健センターC 検体(生肉)3外面	陰性
天びん横(模擬陰性検体検査時)	陰性
天びん横(模擬陽性検体検査時)	陰性
液体培地分注場所(模擬陰性検体検査時)	陰性
液体培地分注場所(模擬陽性検体検査時)	陰性
ストマッカー横(模擬陰性検体検査時)	陰性
ストマッカー横(模擬陽性検体検査時)	陰性
ブロック切分け処理用のクリーンベンチ内(模擬陰性検体検査時)	陰性
ブロック切分け処理用の作業台(模擬陰性検体検査時, クリーンベンチ外)	陰性
ブロック切分け処理用の作業台(模擬陽性検体検査時, クリーンベンチ外)	陰性
模擬陽性検体処理後包丁	陽性
模擬陽性検体処理後トレイ	陽性
模擬陽性検体処理後使い捨て手袋	陽性

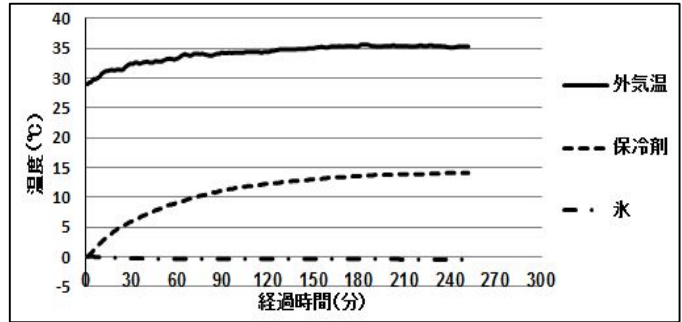


図1 検体搬入容器内の温度変化

表2 模擬陰性検体, 模擬陽性検体及び生食用食肉(市内流通品)の腸内細菌科菌群検査結果

検体名	腸内細菌科菌群(25g)
模擬陰性検体・クリーンベンチ内 1	陰性
模擬陰性検体・クリーンベンチ内 2	陰性
模擬陰性検体・クリーンベンチ内 3	陰性
模擬陰性検体・クリーンベンチ外 1	陰性
模擬陰性検体・クリーンベンチ外 2	陰性
模擬陰性検体・クリーンベンチ外 3	陰性
模擬陽性検体 1	陽性
模擬陽性検体 2	陽性
模擬陽性検体 3	陽性
生食用食肉(市内流通品) 1	陰性
生食用食肉(市内流通品) 2	陰性
生食用食肉(市内流通品) 3	陰性

4 考察

検体搬入容器内の温度は、保冷剤を使用した場合でも外気温の影響により経時的に温度が上昇し、外気温が 30°Cを上回る場合、15 程度で 4°Cを超えることが分かった。生食用食肉の保存温度の基準は冷凍の場合では-15°C以下、冷蔵の場合では 4°C以下と定められていることから、冷凍品はドライアイスを使用することで保存基準を満たすことが可能であるが、冷蔵品の場合では0~4°Cと温度の幅が狭く、保冷剤のみの使用では保存基準を満たすことが不可能であることが判明した。

今回、比較のために行った氷水を使用した場合では0°C±0.5°Cの間で温度が一定に保たれることが分かったが、実際の取去検査で行うには多くの氷を用意しなければならず、また検体が完全に密封されていないとコンタミネーションを起こす危険性がある等、生食用食肉の冷蔵検体の輸送方法についてさらなる検討が必要と思われる。

生食用食肉の検査環境からの汚染の検討について、模擬陰性検体を使用し、クリーンベンチ内及びクリーンベンチ外で切分け処理を行った結果では、どちらの場合でも腸内細菌科菌群が陰性となり差はなく、また、模擬陽性検体の検査時に行った環境中の腸内細菌科菌群の検査結果が陰性であったことから、通常の殺菌手順を行った検査室の環境下で生食用食肉の検査を行うことに問題ないと考えられる。一方、器具の汚染状況の検討では、模擬陽性検体の検査に使用した器具は腸内細菌科菌群に汚染されており、汚染された器具を使用して他の検体を処理するとコンタミネーションを起こすことになるため検体数に見合った器具の準備が必要となる。

今回の検討では、少ない検体数での検討であったため、処理時間も短時間で終了し、良好な結果となったが、多くの検体を複数の検査員で行う場合に起こる相互汚染の可能性や、長時間にわたる処理を行う場合に検査室の環境から汚染される可能性など、引き続き検討しなければならない課題が明らかになった。

最後に、実際に市内流通している生食用食肉を通知法に基づき検査した結果では、腸内細菌科菌群はすべて陰性であった。今回、検体として使用したのは生食用食肉のブロック肉であったが、複数検体のブロック肉を同時に処理を行うには多くの時間を要すること、また検体ごとに器具を交換することや使用済の器具の処理に気を使わねばならないことが実感でき、ブロック状の生食用食肉を複数検体検査することの難しさを感じられる結果となった。

カンピロバクター検査における培地及び迅速性の検討について

微生物部門

○永田 有希, 西中 麻里子, 松本 芳剛, 橋本 貴弘

1 目的

当部門では、カンピロバクターの検査にスキロー培地を使用しているが、他の地研等ではmCCDA培地を使用している所が多く見られる。また、菌の同定までに長時間を要するという課題がある。

これらを踏まえ、スキロー培地及びmCCDA培地を用いて検出感度、夾雑菌の出現状況及び培地の操作性について培地の比較検討を行った。また、同定方法に着目し、API CAMPY、馬尿酸試験及び遺伝子検査（以下「PCR法」という。）における所要時間の比較を行った。

2 方法

市販の鶏肉46検体及びカンピロバクター食中毒疑い事例の患者便7検体を、直接培養法及び増菌培養法により、スキロー培地及びmCCDA培地に塗布して実施した。夾雑コロニーは平板培地に試験液を塗布後、培養時間が48時間以内に出現した非定型のコロニーを観察した。

また、*C. jejuni*及び*C. coli*の陽性菌株を使用し、API CAMPY、馬尿酸試験及びPCR法における所要時間を計測した。

3 結果

mCCDA培地及びスキロー培地の検出感度は鶏肉46検体においてほぼ同等であった。患者便7検体についてはスキロー培地の方が僅かながらカンピロバクターの検出率が高かった。

夾雑菌の出現率については増菌培養法において両培地ともに低かった。しかし、直接培養法では、スキロー培地で2検体に夾雑菌の生育が認められたのに対して、mCCDA培地では15検体に夾雑菌の生育が認められ、夾雑菌が生育しやすい環境であることが分かった。

培地の操作性では、スキロー培地に透過性があるのに対し、mCCDAは成分として炭を含み、培地の透過性がなく釣菌の印をつけることが難しく手間を要した。

菌の同定における所要時間では、API CAMPY及び馬尿酸試験では試験に菌量がある程度必要なため、増菌のために少なくとも一昼夜の培養が必要となる。更にAPI CAMPYでは、試験判定までに24時間の培養が必要となるため、生化学性状の判定後、最低でも2日間が必要となる。また、馬尿酸試験では、3時間程度で結果判定が行えるため、生化学性状の判定後、最短で1日半が必要となる。一方、PCR法ではシングルコロニーからも検査が可能であり、前培養を必要としないため、生化学性状の判定後、遺伝子試薬調製から増幅反応及び電気泳動による結果判定までを7~8時間で判定が可能であった。なお、同定結果は、いずれの同定方法でも一致した。

4 まとめ

スキロー培地及びmCCDA培地ではカンピロバクターの検出感度がほぼ同等であるのに対し、夾雑菌の生育抑制や操作性の良さを考慮するとスキロー培地の方がmCCDA培地に比較して有用であることが分かった。

またカンピロバクター検査の迅速性としては、PCR法が最も結果判定までの時間が短く、食中毒検査等の緊急を要する場合には生化学試験後にPCR法を行い*C. jejuni*または*C. coli*を判定するには非常に有用であると思われた。

牛脾臓のふき取り検査について

食肉検査部門

○泉 千加, 伊東 大輔, 中森 健人, 田邊 輝雄, 多田 二郎, 男成 良之

1 目的

近年、牛レバーの生食による食中毒のリスクが問題となり、平成24年7月からは牛レバーの生食は禁止となったが、その一方で、一部の飲食店では法的規制のない牛脾臓の生食が提供されている。しかしながら、脾臓の生食による食中毒のリスクは明らかになっていない。本研究では脾臓の衛生状態を調査することで、牛脾臓の生食におけるリスクについて検討した。

2 方法

(1) 一般細菌数及び大腸菌群数の測定

平成25年6月から平成26年1月までの間に、京都市中央卸売市場第二市場に搬入された102頭の牛の脾臓を検体とし、検査方法は食品衛生検査指針（微生物編）に準じて実施した。と畜解体工程の内臓摘出直後の脾臓表面100cm²を「ふきふきチェックⅡ（栄研化学）」を用いてふき取ったものを試料原液とし、滅菌生理食塩水で10倍段階希釈を行い、10,000倍までの希釈液を作製した。試料原液及び希釈液を用い、一般細菌数は標準寒天培地を、大腸菌群数はデスオキシコーライト寒天培地を用いて培養し1cm²あたりの菌数を算出した。また、脾臓表面の消化管内容物による汚染状態を記録し、脾臓表面の細菌数との関連を調査した。

(2) 脾臓の細菌汚染状況と牛枝肉の細菌汚染状況との関係

脾臓のふき取りを実施した個体と同一個体の牛枝肉の胸部及び肛門周囲部を枝肉冷蔵庫内でふき取り、一般細菌数及び大腸菌群数を測定した。当と畜場で枝肉の微生物汚染の目安としている基準（一般細菌数は1,000個/cm²、大腸菌群数は3個/cm²）以上の個体とそれ未満の個体における脾臓の細菌汚染状況を比較した。一般細菌数については、枝肉胸部及び肛門周囲部の一般細菌数がともに1,000個/cm²未満の個体群を「枝肉細菌数<1,000」と表し、枝肉胸部または肛門周囲部の一般細菌数のどちらかあるいは両方が1,000個/cm²以上の個体群を「枝肉細菌数≥1,000」と表した。大腸菌群数においては、枝肉胸部及び肛門周囲部の大腸菌群数がともに3個/cm²未満の個体群を「枝肉大腸菌群数<3」と表し、枝肉胸部または肛門周囲部の大腸菌群数のどちらかあるいは両方が3個/cm²以上の個体群を「枝肉大腸菌群数≥3」と表した。

(3) 0-157及び0-111保有状況の調査

試料原液をノボオキシシン加mEC培地に添加し、42℃で24時間培養した後、シングルパス0-157及びNHイムノクロマト0-111を用いてスクリーニング検査を実施した。

(4) サルモネラ属菌保有状況の調査

試料原液をラポポート液体培地に接種し、37℃で24時間～48時間培養後、ES1及びES2寒天培地に塗布し、24～48時間培養した。培養後の培地に疑わしいコロニーが認められた場合、PCRを実施し特異的なバンド検出の有無を確認した。

3 結果

脾臓表面の細菌数の値は、一般細菌数ではND（検出下限値以下）から 2.08×10^5 個/cm²、大腸菌群数ではNDから 8.7×10^4 個/cm²とばらつきが認められた。また、消化管破損のない検体よりも消化管破損のある検体で一般細菌数及び大腸菌群数の値が高かった（図1及び図2）。

脾臓表面の一般細菌数が1,000個/cm²以上であった検体の割合及び脾臓表面の一般細菌数の平均値は、枝肉細菌数<1,000個体群より枝肉細菌数≥1,000個体群で多かった（表1及び図3）。一方、大腸菌群数では、脾臓表面の大腸菌群数が3個/cm²以上であった検体の割合及び脾臓表面の大腸菌群数の平均値は、枝肉大腸菌群数≥3個体群よりも、枝肉大腸菌群数<3個体群で多かった（表2及び図4）。

全ての検体において0-157、0-111スクリーニング検査は陰性であった。また、脾臓表面のサルモネラ菌汚染状況を全検体中15検体で検査し、全ての検体で陰性であった。

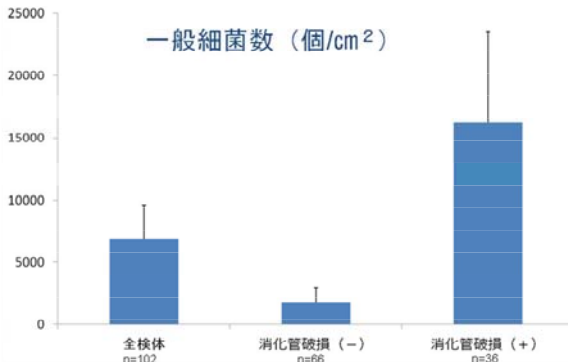


図1 消化管破損による脾臓の一般細菌数の比較

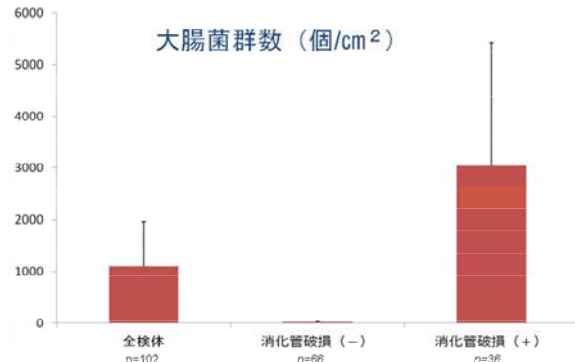


図2 消化管破損による脾臓の大腸菌群数の比較

表1 枝肉の細菌汚染と脾臓の細菌汚染の関係(一般細菌数)

	脾臓一般細菌数 ≥ 1000 検体数(割合)	消化管破損(-)かつ 脾臓一般細菌数 ≥ 1000 検体数(割合)
枝肉細菌数 < 1000 (n=17)	1/17(5.9%)	1/13(7.7%)
枝肉細菌数 ≥ 1000 (n=21)	5/21(23.8%)	4/15(26.7%)

表2 枝肉の細菌汚染と脾臓の細菌汚染の関係(大腸菌群数)

	脾臓大腸菌群数 ≥ 3 検体数(割合)	消化管破損 検体数(割合)
枝肉大腸菌群数 < 3 (n=33)	12/33(36.4%)	9/33(27.3%)
枝肉大腸菌群数 ≥ 3 (n=5)	1/5(20%)	1/5(20%)

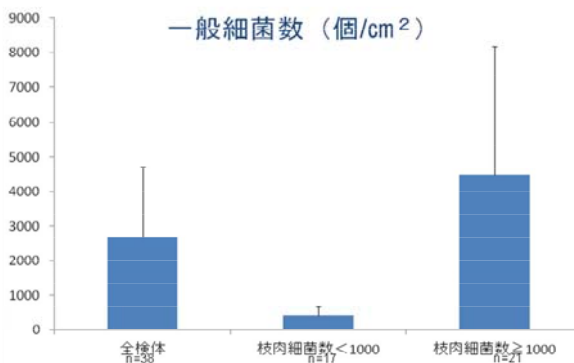


図3 枝肉汚染による脾臓の一般細菌数の平均値の比較

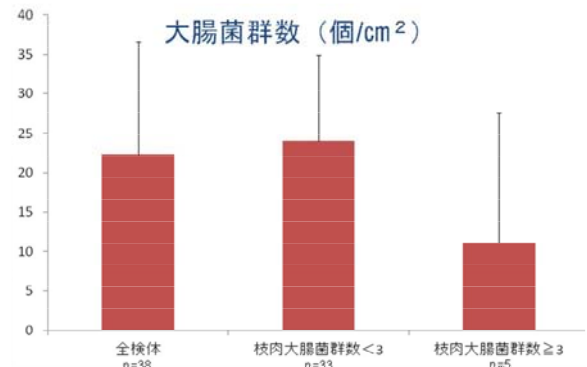


図4 枝肉汚染による脾臓の大腸菌群数の平均値の比較

4 考察

脾臓表面の細菌数は個体により大きな差が認められた。また、今回の調査では0-157、0-111及びサルモネラ属菌は検出されなかったが、大腸菌群数の値が高い検体も存在することから、脾臓がこれらの食中毒原因菌などに汚染される可能性は高いと考えられる。このことより脾臓の生食は食中毒のリスクが高いと言える。

脾臓表面の一般細菌数及び大腸菌群数の値において、消化管の破損が認められた個体では、消化管の破損がない個体より高い結果となったため、消化管の破損は脾臓表面の衛生状態に影響を及ぼしていると言える。また、枝肉の一般細菌数の値が高い個体群では、脾臓表面の一般細菌数の値が高い検体の割合が多かった。このことより一般細菌による枝肉の汚染原因と脾臓表面の汚染原因には共通の原因が存在する可能性があると言える。しかしながら、枝肉の大腸菌群数の値が高い個体における脾臓表面の大腸菌群数は高値を示していなかったことから、枝肉及び脾臓表面の大腸菌群による汚染は、それぞれ異なる部分に汚染の原因が存在するためにこのような結果を示したのではないかと推察される。枝肉及び脾臓表面の細菌汚染の関係性については、さらに調査を行い汚染の原因を究明することが必要であると言える。

これらの結果を踏まえ、私たちと畜検査員は食肉の衛生を維持するために、牛体表の衛生保持はもちろん、確実な食道結紮及び肛門結紮、消化管の破損防止などの解体作業工程における衛生管理を指導していくことが重要であると言える。

今回は牛から摘出した直後の脾臓を調査したが、今後は副生物の処理した後の脾臓の細菌汚染状況も調査することで、衛生的な処理工程が実施されているかの確認をしておく必要がある。今後も調査を継続し、他の食中毒原因菌の保有状況などを調査することで食肉衛生の更なる向上につなげていきたい。

と畜場に搬入されたウシにおけるボルナ病ウイルス血清疫学調査
食肉検査部門

○泉 千加, 村北 佳史, 西野佳以 (京都産業大学総合生命科学部)

1 目的

ボルナ病ウイルス (BDV) は、19 世紀末にドイツ東部のボルナ地方のウマで流行した、致死性の非化膿性脳脊髄炎を主徴とする「ボルナ病」の原因ウイルスである。BDV はモノネガウイルス目に属する、非分節、1 本鎖のマイナス鎖 RNA ウイルスであり、神経向性に持続感染する特徴がある。

近年の世界的な疫学調査の結果から、BDV は中央ヨーロッパのみならず、アジアやアメリカからも自然感染動物が見つかっている。また、ウマ以外にウシ、ヒツジ、ネコ、ダチョウ、アライグマ、ニホンザル、ヒトなど数多くの温血動物がその抗体を保持していることも報告されている。日本も例外ではなく、ホルスタインや黒毛和種など一見健康なウシで抗 BDV 抗体が検出されている。ウマの急性型の症状は、運動器障害 (運動失調、転倒、旋回運動) と意識障害が特徴的であり、臨床経過は数日から 3 週間以上、致死率は 50% である。一方、ウシの発症例は少なく、運動器障害 (旋回運動、麻痺、斜頸) と行動学的異常 (不安) などが報告されているが、多くは不顕性感染である。最近、日本の乳牛において、BDV 抗体陽性群における受精障害 (発情周期は正常だが非妊娠期間の長期化、人工授精回数の増加) が報告されており¹⁾、BDV 感染牛が多い酪農家は不妊症などの問題を抱えている可能性が危惧されている。

本研究では、ウシにおける BDV 感染状況を把握し、感染におけるリスクファクターの有無を調べることを目的として、京都市食肉検査部門に搬入されたウシにおける抗 BDV 血清疫学調査を行った。

2 方法

平成 23 年 6 月 24 日から 10 月 20 日までの期間に京都市中央卸売市場第二市場に搬入されたウシ 80 頭を任意に選び採血した。ウシの内訳は、黒毛和種 71 頭、ホルスタイン 5 頭、F1 (雑種) 4 頭であった。血清は非働化し、豚肝パウダーで吸収処理をした。

間接蛍光抗体法 (IFA)、ELISA 法及びイムノブロット (WB) 法により血清学的診断を行った。IFA では、BDV-He80 株持続感染 MDCK 細胞あるいは非感染の MDCK 細胞を冷アセトンで固定して抗原として用い、定法に従って行った。ELISA 法と WB 法では、組換え BDV-P 蛋白質を抗原として用いた。IFA あるいは ELISA/WB 法による抗体陽性検体を抗 BDV 抗体陽性検体と判定した。

3 結果

IFA 法による陽性検体は 80 頭中 6 頭 (7.5%)、WB/ELISA 法による陽性検体は 19 頭 (23.8%)、双方の検査方法において陽性であった検体は 4 頭であった。いずれかの方法で陽性であった検体は 21 頭 (26.3%) であった。

ウシの種類における抗体陽性率は、黒毛和種は 71 頭中 19 頭 (26.8%)、F1 は 4 頭中 2 頭 (50.0%) であった。ホルスタイン 5 頭の血清は検出感度以下であった。

性別における抗体陽性率は、黒毛和種の牝 40 頭中 12 頭 (30.0%)、雄 31 頭中 7 頭 (22.6%) が抗 BDV 抗体陽性であった。また、黒毛和種の牝において、未経産牛 23 頭中 8 頭 (34.8%)、経産牛 17 頭中 4 頭 (23.5%) が抗 BDV 抗体陽性であった。

本試験で調査したウシの産地は、京都府、鹿児島県、長野県、岡山県、兵庫県、北海道、長崎県及び宮崎県の計 8 県であった。京都府由来のウシは今回の調査で一番頭数が多く 34 頭であり、すべて黒毛和種であった。生産県別の黒毛和種の抗体陽性率は、京都府は 34 頭中 10 頭 (29.4%)、鹿児島県は 9 頭中 3 頭 (33.3%)、長野県は 10 頭中 4 頭 (40.0%)、兵庫県は 4 頭中 2 頭 (50%) であった。北海道の 10 頭、長崎県の 3 頭、宮崎県の 1 頭はすべて検出感度以下であった。

4 考察

と畜場に搬入されたウシ 80 頭における抗 BDV 抗体保有率を調べたところ、21 頭 (26.3%) が抗体陽性であった。これまでの日本のウシ (ホルスタイン、黒毛和種) における疫学調査では、ホルスタインは 20.3% (BDV-P 蛋白質抗体を検出、Hagiwara ら 1996 年)²⁾、黒毛和種 28.7% (BDV-P と N 蛋白質抗体を検出、Watanabe ら 2006 年)³⁾ という報告があり、今回

の調査結果はほぼ同等の陽性率と考えられる。少なくとも、京都、鹿児島、長野及び兵庫県を産地とする黒毛和種には、一定数のBDV抗体陽性牛が存在していることが示された。ウシにおける抗体陽性率の地域差については情報はないが、酪農家ごとに陽性率がかなり異なるといわれていることから、おそらくある程度の差があるものと考えられる。

また、黒毛和種においては、牝の方が雄よりも抗体陽性率が高い傾向があり、また牝ウシのなかでは未経産牛のほうが経産牛よりも抗体陽性率が高い傾向が示された。

今後、さらに検査頭数を増やすことにより、抗体陽性検体に関する地域差、性別、出産の有無等について解析し、抗体陽性検体の特徴や傾向を把握したい。

5 文献

- 1) Hagiwara K, Ando T and Koiwa M. The influence of Borna disease viral infection on dairy cow reproduction. *J Vet Med Sci.* 2012, 74(4):419-421.
- 2) Hagiwara K, Nakaya T, Nakamura Y, Asahi S, Takahashi H, Ishihara C and Ikuta K. Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy dairy cattle. *Med Microbiol Immunol.* 1996, 185(3):145-151.
- 3) Watanabe Y, Yanai H, Ohtaki N, Ikuta K, Tomonaga K. Prevalence of Borna disease virus antibodies in healthy Japanese black cattle in Kyushu. *J Vet Med Sci.* 2006, 68(2):171-174.