

計3群とした。加熱処理に際しては滅菌蒸留水1Lを用いて予め洗浄・熱湯消毒した鍋容器に注水し、10分間沸騰させた。その後、水温を $92\pm 1^{\circ}\text{C}$ または $88\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調節・安定化させた後、供試検体を加えた。沸騰水処理群での加熱時間は、 $10\cdot 30\cdot 60$ 秒間とし、検体投入中の湯温変化を温度ロガーで経時測定した。処理後、検体は滅菌済アルミ製ザルで掬い上げ、予め氷上で保存したBPW 100 mlの入った滅菌ストマッカー袋に入れ、氷上で急冷させた。ホモゲナイザーを用いて1分間十分に攪拌させた後、100  $\mu\text{l}$ をVRBGおよびクロモアガーO157寒天培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$ で20時間培養後に発育した集落数を求め、D値算出に供した。

### C. 研究結果

#### 1. 牛タン表面の洗浄方法に関する検討

無処理対照群を100%とした場合の、水道水処理群での接種菌汚染菌数は1回洗浄後に約71%、5回洗浄後には約52%となった(図2)。一方、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(100ppm)洗浄群では、1回洗浄後では約85%であったが、2回洗浄後には約33%、5回洗浄後では約9%にまで低減を示した(図2)。これに比べて、微酸性電解水洗浄群では、一回洗浄後に約24%にまで低減を示す等、より速やかな殺菌効果が認められた(図2)。一般細菌数及び腸内細菌科菌群の低減効果についても同様の傾向を認めた。

#### 2. 牛ミノにおける煮沸加熱条件に関する検討

牛ミノ検体を煮沸加熱した場合の一般細菌数および腸内細菌科菌群数は、加熱10秒で、未加熱群に比べて有意な減少を示したが、30秒及び60秒煮沸群では、更なる低減を示した(図3及び4)。加熱中の湯温は著しい変動を認めなかった(図5)。

それぞれの指標菌に対するD値は一般細菌

に対しては、59.7秒、腸内細菌科菌群に対しては32.3秒となった(図6)。

### D. 考察

牛タン表面における細菌汚染低減に関する検討では、微酸性電解水が、次亜塩素酸水や水道水に比べて、より速やかな菌数低減効果を示した。電解水の内部浸透性は次亜塩素酸に比べ弱いとされている一方で表面での効果発現はより速やかと解される。本研究の成績は、したがって、牛タン検体における細菌汚染分布は概ね外表面に限定されることを示唆しているといえよう。また、牛ミノを用いた自然汚染指標菌数の低減に資する煮沸条件に関する検討成績は、調理段階にあつて少なくとも1分間の煮沸処理が当該検体に対して望ましいという結論を導くものと考えられた。

### E. 結論

牛タンを洗浄する際には、表面での細菌汚染を主眼に置いた上で、速効性を示す洗浄溶媒の使用が望ましいと考えられた。また、牛ミノを煮沸する際には、少なくとも1分間の同処理が望ましいとの結論を得た。

### F. 健康危機情報

該当なし

### G. 研究発表

該当なし

### H. 知的財産権取得状況

該当なし

図1. 牛タン洗浄に関するワークフロー

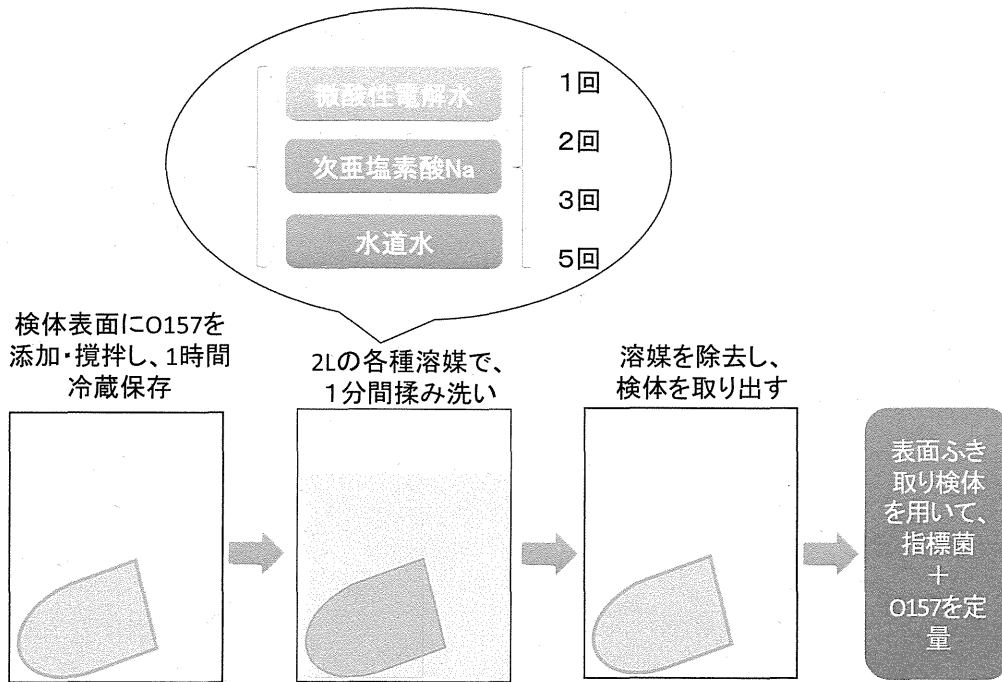


図2. 洗浄を通じた、牛タン表面での細菌汚染低減に関する検討

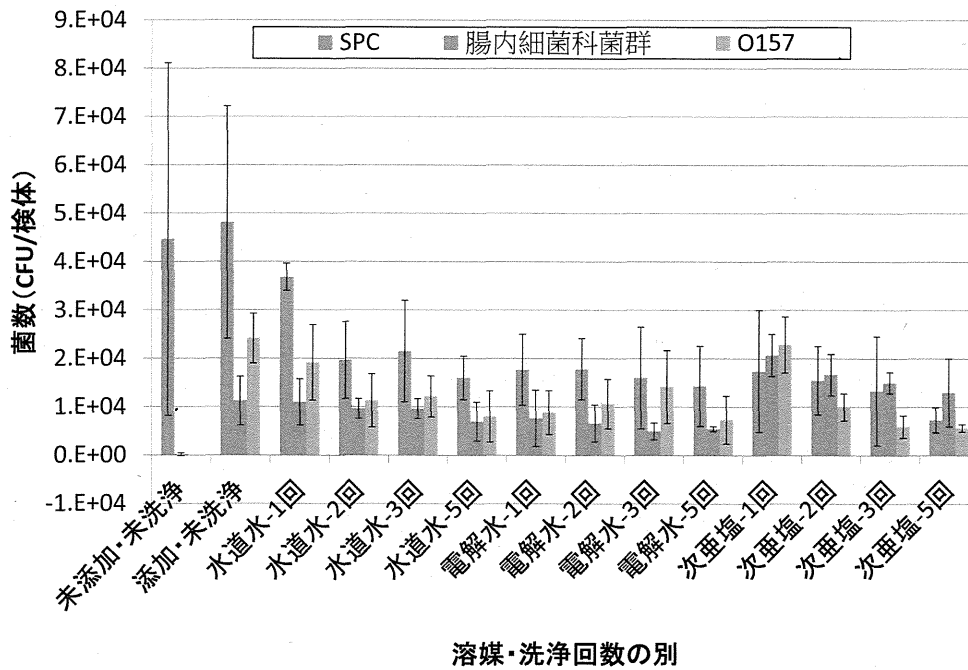


図3. 煮沸処理を通じた牛ミノ検体における一般細菌数の変動

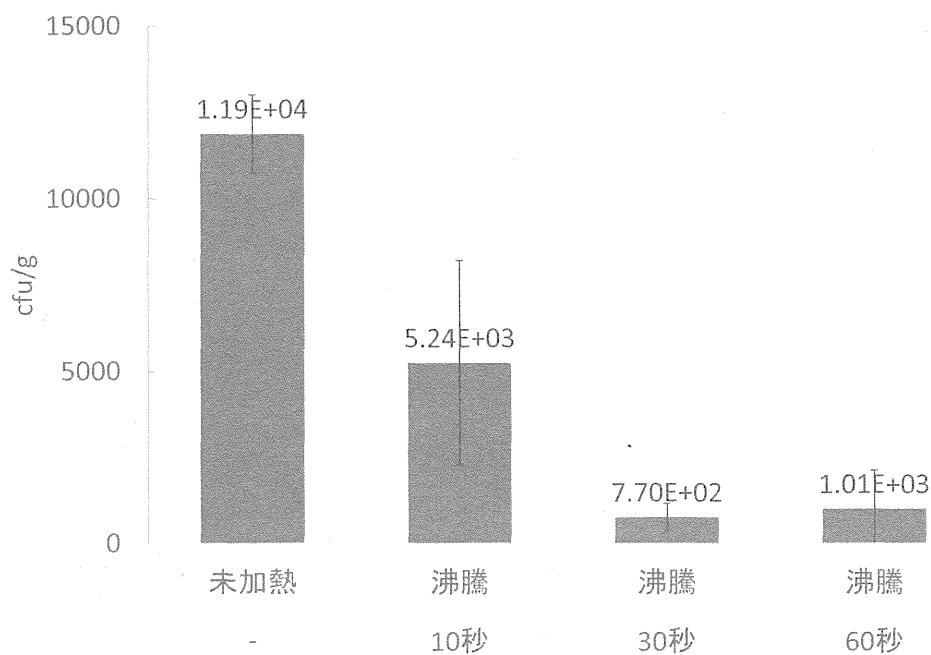


図4. 煮沸処理を通じた牛ミノ検体における腸内細菌科菌群数の変動

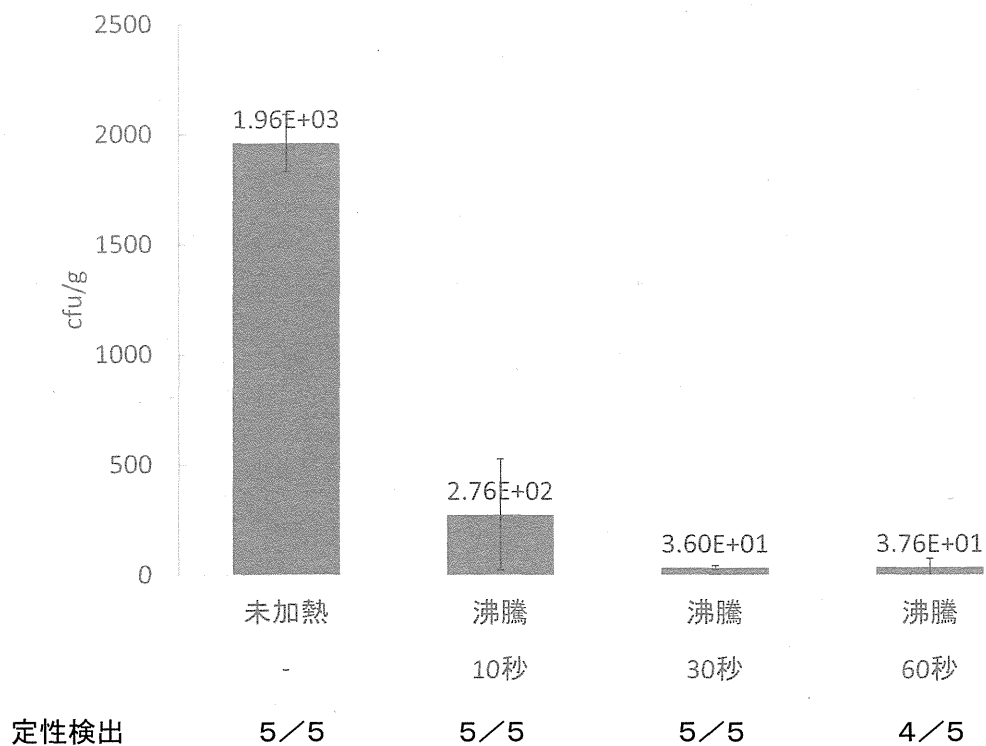


図5. 牛ミノ検体の加熱処理工程における煮沸水の湯温変化

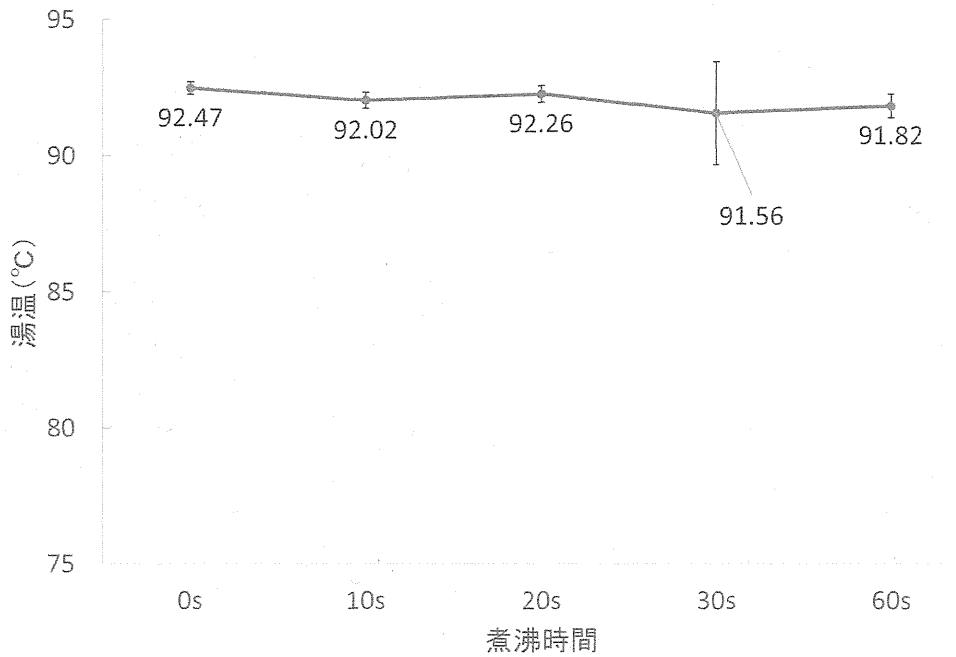
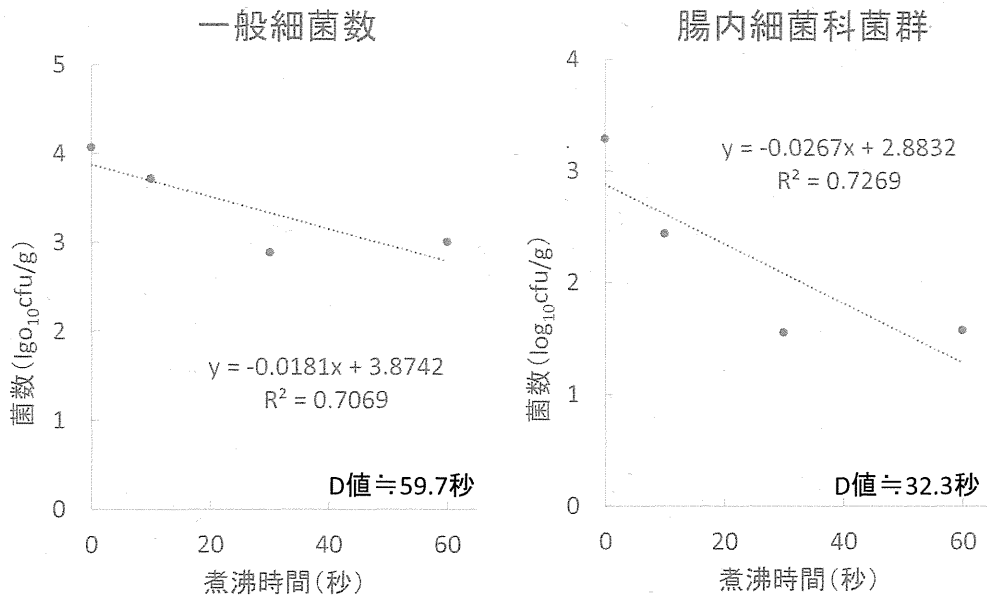


図6. 煮沸時間に伴う牛ミノ検体自然汚染指標菌数の低減性



少なくとも1分程度の煮沸加熱が望ましい

平成26年度厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

分担研究報告書

と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

研究分担者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：

と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

食肉衛生検査は、疾病排除を主体として、食中毒予防のための食肉の衛生管理などが含まれている。その中でも、疾病廃除のための診断技術を平準化することにより、全国で同一レベルの食肉検査を行うことが可能となることが期待される。これまで、と畜・食鳥検査における疾病診断は食肉検査マニュアルを改訂することにより、診断に関する基本的事項については示している。しかしながら、全国のと畜検査員が同じ基準で疾病診断をする際の肉眼的診断の標準化についてどのような方法がよいかを検討する必要がある。

26年度は敗血症についてマニュアルの改訂ポイントを示した。

研究協力者

宮手 浩 神奈川県食肉衛生検査所

梶川典子 神奈川県食肉衛生検査所

楠 哲也 神奈川県食肉衛生検査所

川久通隆 兵庫県食肉衛生検査センター

橋本勝弘 埼玉県食肉衛生検査センター

橋本夏美 さいたま市食肉衛生検査所

横溝力男 横浜市食肉衛生検査所

渡辺茂樹 千葉県東総食肉衛生検査所

畑野克巳 千葉県東総食肉衛生検査所

小林清美 宇都宮市食肉衛生検査所

品川邦汎 岩手大学

療科学院の食肉衛生検査コースのテーマ研究において検討した。

C. 研究結果

食肉検査マニュアルの問題点として、1. 必要と思われる写真やフロー図がない、2. 検査マニュアルだけで完結しない、3. 診断・類症鑑別に教科書的表記が混在している、4. 農場での所見と・とちく場で見られる所見が混在している、5. 甚急性と慢性の記載が混在している、6. 表現がと畜検査上一般的ではない、7. 繰り返し同じ内容が記載されているとの指摘があった。

マニュアルに必要な項目として、1. 解説、2. 保留基準、3. 採材方法、4. 類症鑑別、4. 検査方法、5. 判定基準、6. 措置についてそれぞれの項目について要点を示し、1冊で完結させる必要がある。

平成26年度は、別添のように敗血症のマニュアルについて改訂のポイント示した。

A. 研究目的

本研究は、食肉検査マニュアルの改訂のためにマニュアルのあるべき姿についても検討する。

B. 研究方法

食肉検査マニュアル改訂のために食肉検査マニュアルのあるべき姿について保健医

#### D. 考 察

食肉衛生検査マニュアルはマニュアルというよりは教科書的にまとめられていることから、食肉衛生検査にはそのまま使いづらいところがある。改訂が必要と考えられた。

たとえば、と畜検査の作業をフロー図にまとめ、チェックシート形式にすることは、各自治体の疾病診断を平準化することに役立つものと考えられた。

#### E. 結 論

食肉衛生検査マニュアルは現場での使用

を視野に入れた改訂が必要である。

#### F. 健康危機情報

該当無し

#### G. 研究発表

該当なし

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし

# と畜検査マニュアルについて

## 疾病の診断基準

検査所内での問題&と畜検査マニュアルの問題

## 各検査所の問題点

- ・ 検査所の検査員によって判断基準が異なる  
経験年数・人員不足・知識の伝達の不均一化
- ・ 自治体、地域によって判断基準が異なる  
同じ農場から出荷しても、廃棄状況が異なる  
保留基準等、疾病に対する解釈が自治体によって異なる
- ・ 機器の充実度が違うため検査方法が異なる  
検査所の規模、と畜場の規模

## 検査マニュアルの問題点

- ・ 必要と思われる写真やフローがない
- ・ 検査マニュアル一冊で完結しない  
(検査法の詳細については、〇〇を参照)
- ・ 診断一類症鑑別に教科書的表記が混ざ
- ・ 農場での所見と、と畜場でみられる所見が混在
- ・ 甚急性と慢性の症状の表記が混在
- ・ 表現がと畜検査上一般的でない  
(肉眼病理学的を病理学的)
- ・ 繰り返し同じ内容が記載

## 理想のマニュアル像とは

- ・ 一冊で完結  
(SOPとアトラスが盛り込まれている)
- ・ 実際のと畜検査の中で使える
- ・ グレーゾーンが解消され
- ・ 読みやすい、使いやすい  
(フローチャート、チェックリスト付き)
- ・ 初心者が見てわかりやすい



# マニュアルのアウト ライン

- 解説
- 保留基準
- 採材方法
- 類症鑑別
- 検査方法
- 判定基準
- 措置

## 「解説」のポイント

**解説**

敗血症は種々の病原体の感染によって起こる全身性の症状(悪寒・発汗、不整脈・浮腫など)を伴う疾病に対する総称的な名称である。まれに非細菌性(真菌・ウイルス等)の敗血症もあるが、一般には一定組織に細菌感染による一次病巣(原発巣)が存在し、そこから持続的にあるいは断続的に病原菌が血行中に送り込まれた結果、原発巣付近あるいは遠隔の場面に二次病巣が形成され全身感染、すなわち敗血症を起こす。本症はその性質上、出現する病巣は多発であり、原発巣、二次病巣の存在が必ずしも明瞭でないことがしばしば見られる。

さまざまな細菌感染症の末期は、すべて敗血症状態を示すので、いずれも敗血症の範疇に入る。

と畜検査における敗血症とは、種々の細菌によって起こる

①全身性の症状を呈し、血液中に菌の存在が確認されたもの  
 ②肉眼病理学的に敗血症を疑う所見を呈し、臓器、(む)臓、筋肉のいずれかの2・ig以上から同一の菌種が99されたもの  
 ③肉眼病理学的に敗血症の一般所見を呈するもの

図1と畜検査における狭義の敗血症概念

であり、ここでいう敗血症とは化膿性転移の傾向の強い敗血症である腸毒症など、と畜場法施行規則第16条別表第4に明記されている疾病を除く状態のものである(図1)。さらに非定型抗酸菌による敗血症もみられるが、病態・検査法が特殊なため別項目とする。

生体検査で本症が疑われる場合は、一般に発熱、呼吸困難、可視粘膜充血、皮膚のチアノーゼ、剛硬、栄養不良、下痢、起立不能、興奮状態などの全身症状を認めることが多い。子宮炎、乳房炎、とくの出血性腸炎、初生獣の肺炎・腸炎、関節炎、創傷等に起因するものもあり、原発巣が外部から認められない場合もある。そのため体温測定を含む一般臨床検査に加え血液の細菌検査(直接塗抹)を行い、総合診断を行う必要がある。

解体後の検査で本症が疑われる場合は、敗血症に伴って発現する可能性の高い諸症状および原発巣の発見に努める必要がある。もとより敗血症の各症状は、病原菌の種類、侵入門戸、細菌の毒力、疾病の経過および生体における防御機能などが関与し、多種多様な病像を呈する可能性がある。敗血の状態、死後硬直の状態、筋肉のpHの経時的推移、筋肉の硬直および色調、臭気なども本症を疑う因子となりうる。正常な筋肉のpHは、と置直後は中性を示すが、筋肉内のグリコーゲンが分解されて産生される乳酸のために急速に下降し、数時間内には5.0以内になる。これに対し、敗血症罹患動物の筋肉は、pHの下降は極めて軽微か、あるいはほとんど認められない場合が多い。すなわち、時間が経過しても、持続的にアルカリ性を示す。また、肉質は暗赤色を示し一定の時間が経つと、アセトン臭を含む一種の悪臭を放つ。肉を加熱してみれば、その悪臭は明瞭となる。ただしこれらの変化は、敗血症の初期の段階でと置されたものではほとんど認められないが、と体の程度の敗血不良、中等度の黄血を認める場合がある。

本症が疑われる臨床症状を示す場合でも、解体後の所見が明瞭でない場合がしばしばある。よって、生体検査の臨床所見と総合して慎重な判断を下す必要がある。さらに検査に際しては、薬剤の影響も考慮に入れて実施する必要がある。

本症を疑う所見を示すもので、解体後の検査では判定困難なものについては細菌検査を実施し、菌の体内分布を調べたうえで判定を下す必要がある。

過去に実施された調査によると、動物種と原因菌との関係は以下のようである。これらの菌の多くの場合は単独で、また一部は2種類の組み合わせで検出されている。

牛: *Arctobacterium pyogenes*(同義語: *Corynebacterium pyogenes* *Actinomyces pyogenes*)、*ブドウ球菌*、*グラム陽性桿菌*、*腸球菌*、*レンサ球菌*、*溶連菌*、*次球菌*、*グラム陰性桿菌*  
 豚: *Arctobacterium pyogenes*、*常菌*、*レンサ球菌*、*グラム陽性桿菌*、*グラム陰性桿菌*  
 とく: *病原大腸菌*、*グラム陰性桿菌*

- 情報量は減らしていない
- 似たような表現を簡略化
- 診断以降の項目で、概論的な記述を解説に盛り込んだ
- と畜検査における狭義の敗血症の図式化
- 敗血症の定義で「細菌の感染」を「病原体の感染」とした(ウイルスー真菌)

# 「保留基準」のポイント

**保留基準**

(1) 生体検査時

採内の部位に注意し、検査員が同意し採材した場合は保留し、体測測定及び行自する。直死体検体を採材しプログラム検査を行い、直死体検体間の関係を確認する。結果により判定基準へ。

子アノ一、呼吸困難、起り下座、発音不発、発熱、驚せん、下痢、可視粘膜出血、乳頭の発紅、外陰部からの膿状分泌の露出



左側は採材したアノ一、右側は採材したアノ一

(2) 屠体検査時

伝染性心内膜炎発症の場合や採内のしずかの所見がある場合、検査員が必要と判断した場合は保留し検査検査を行う。

臓器、リンパ節、筋肉及び皮下脂肪の出血(症状出血又は採出血)  
 臓器の異常腫脹、リンパ節の腫脹  
 腎臓の硬変  
 臓器、筋肉及び脂肪の発赤



右側は採材した臓器、左側は採材した臓器

- 写真を掲載した
- 症状、所見を箇条書きにした

# 「採材部位」のポイント

**採材部位**

以下の点に注意して、採内の部位及び検査員が必要と判断した部位について採材すること。

- 病変部を中心に採材すること。
- 再検査にそなえて十分な量を採材すること。
- リンパ節においては、敗血症を証明できるように離れた2ヶ所以上を採材すること。  
(例:内側腸骨リンパ節と浅頸リンパ節)

心臓(症状病変部と心筋)、腎臓、肝臓、脾臓、リンパ節、筋肉

- 主に採材すべき部位を箇条書きにした
- 採材量、採材方法等も記載した

# 「類症鑑別」のポイント

## 類症鑑別

解体後検査で認められた所見	留意する疾病
疣贅性心内膜炎	豚丹毒 など
臓器、リンパ節の出血、腫脹	中毒、サルモネラ症、トキソプラズマ病 など
臓器、筋肉、脂肪の黄変	黄疸 など

- 解体後検査でよく認められる所見別に、分かりやすく表にまとめた

# 「検査方法」のポイント

## 検査方法

### 【準備するもの】

ハサミ、ピンセット、ビーカー、消毒用アルコール、消毒綿、トレー、スプレー、アネロバック青銅ジャー、標本パック、血液滅菌液、スライドガラス、染色液（スタンプにて検体を標本する場合）、白金皿、白金鉢（乳剤を作成する場合）、ストマック一回し、ストマック一回し、コンラージ種、生理食塩水、マイクロピペット、はかり

### 【方法】

#### (1) 目的

##### (1) 検体への標本採取

###### ① スタンプにて検体を標本する場合は

十分に熱したスプレーを標本採取部位に押し当て滅菌した後、滅菌ピンセット及びハサミ（消毒用エタノールに浸した傷カスパーナーであったら）を使用して 1cm 角位に切り出し、検体にスタンプする。

もしくは、検体全体を消毒用アルコールに浸し、十分に熱したスプレーもしくはカスパーナーで標本を滅菌した後、滅菌ピンセット及びハサミを用いて標本を標本させ、検体にスタンプする。

必要に応じて、白金皿及び白金鉢で標本する。

※ あらかじめ検体表面を充分消毒で充分に乾燥させる。

###### ② 乳剤を作成する場合

十分に熱したスプレーを用いて標本採取部位を滅菌する。もしくは、検体全体を消毒用アルコールに浸し、十分に熱したスプレーもしくはカスパーナーで標本を滅菌する。滅菌ピンセット及びハサミを用いて切り出した検体 2-3g を細切し、9 容量の滅菌生理食塩水とともにストマック一回し入れ、1 分間ストマッキングする。できあがった 10% 乳剤を検体に 100 山を下し、コンラージ種で塗布する。

※ 検体は検定終了まで冷蔵庫で保存する。

#### (2) 培養

培養および培養条件は 55-57℃、1-2 日間培養を行う。

#### (3) 必要に応じて実施するもの

直接鏡検、心臓が他家細菌の菌叢をスライドガラスにスタンプし、グラム染色を行い観察する。



グラム染色検査



グラム染色検査

※ 豚において、心臓標本採取時にグラム染色検査を認めた場合は、豚丹毒である可能性を考慮し検査を実施する。詳細は「豚丹毒」の項を参照。

- 検査結果の写真を掲載
- 一通りの検査を行えるように準備品から記載
- レイアウトを工夫



# 「検査方法」のポイント

**① ①日目**



(1) 科地発菌なし、検体に負有する菌のコロニー形態、性状、増殖性を確認するとともに、グラム染色を行い、菌の形態、染色性を確認する。必要に応じて生化学試験や規定キッツを用いて菌種を特定する。



・生化学試験(詳細は次ページ参照)  
 ・カタラーゼ試験  
 ・部分顕微鏡 等

・菌血症

○膿血  
 コロニー周囲が黄褐色化、  

 ○溶血  
 コロニー周囲が透明、  


・分離菌株の集約書

グラム陽性球菌  
*Staphylococcus* 属  

*Staphylococcus* 属  


グラム陰性桿菌  
*Escherichia shigaeiformis*  

*Acetivibrio rhusopathus*  


・菌において、グラム陽性桿菌を認めた場合は、該当菌株である可能性を考慮し検査を実施する。詳細は「検出者」の項を参照。

**② ②日目**

(2) 必要に応じて実施する生化学試験

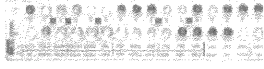
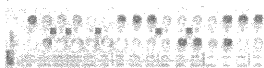

・カタラーゼ試験  
 コロニーの中央を白金棒で採り、きれいなスライドガラス上におく。菌の上10秒に満たぬ1%濃硫酸水素水または過酸化水素水を1滴のせる。ただちに気泡が出るものが陽性。

・糖分解試験  
 分離菌の菌種を特定するには、適切な装置を用いて試験を実施する必要がある。標準に実施する場合は、高濃キッツ(シメツクス社アビシリーズ、シメツクス社ハイテックシリーズ、日本 BIOTECHNICAL 等)を使用することも可能である。

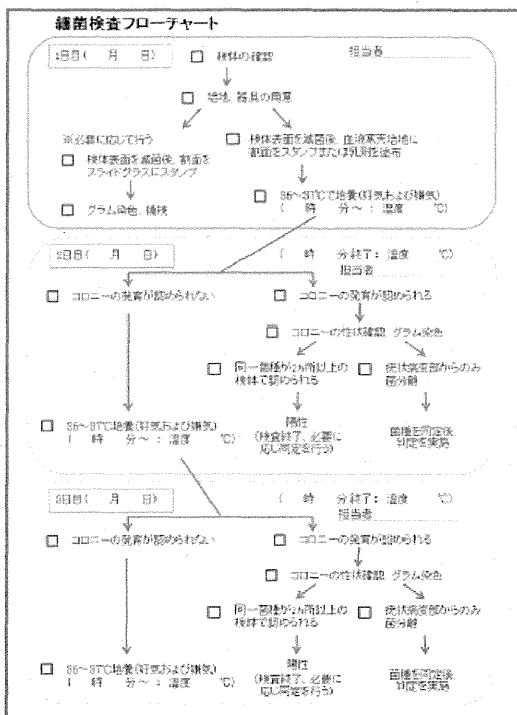
(参考) シメツクス社アビシリーズ

・ブドウ糖発酵

カタラーゼ陽性桿菌、糖分解菌	アビD28 ストレプト
カタラーゼ陰性桿菌	HD2 スタフ
培養に <i>Ameshaerol</i> 属	アビコリア
・グラム陰性桿菌	HD28IN アビ
・連鎖球菌	カビD2 HD2A

●カビD28 ストレプトでの結果例  
*Streptococcus* 属(その1)  
  
*Streptococcus* 属(その2)  
  
*Escherichia shigaeiformis*  


# 「検査方法」のポイント



- 実用的なフローチャートを掲載
- 検査経過の記載および管理が可能

# 「判定基準」のポイント

## 判定基準

(1) 生体検査時 全身性の症状を呈し、血液中に菌の存在が確認されたもの。	・ 3(いずれか 2ヶ所)以上 ・ 心臓症状病変部+ (臓器、筋肉、リンパ節のいずれか 1ヶ所)
(2) 解体後検査時 ① 肉視病理学的に敗血症を疑う所見を呈し、臓器・リンパ節・筋肉のいずれかの2ヶ所以上から同一の菌種が分離されたもの、もしくは死状病変部から病原菌が分離されたもの。	・ 臓器2ヶ所 ・ 臓器1ヶ所+筋肉 ・ 臓器1ヶ所+リンパ節1ヶ所
② 肉視病理学的に敗血症の一般所見を呈するもの、すなわち全身性(臓器、リンパ節、筋肉及び皮下線)の出血、主要臓器の混濁腫脹、リンパ節の腫脹、出血等多くの所見を示すもの。	・ 筋肉+リンパ節1ヶ所 ・ リンパ節2ヶ所
* 病原菌とは日本細菌学会「病原性安全取扱・管理指針」によりバイオセーフティレベル1*以上で分類される細菌、またはその種の文献等によりヒト及び動物に対する感染性が明らか細菌。	
* 日本細菌学会「病原性安全取扱・管理指針」によるバイオセーフティレベルの設定	
(1) バイオセーフティレベル1の細菌 バイオセーフティレベル2以上の細菌を除くすべての細菌がバイオセーフティレベル1であるが、レベル1のうち、人からの分離例があり、日和見感染症を起こす可能性のある菌種をレベル1*に分類している。	
(2) バイオセーフティレベル2の細菌 健康人に感染症を起こす能力を持ち、その危険度が軽度ないし中等度であるもの。	
(3) バイオセーフティレベル3の細菌 感染量が小さいため感染性が高く、重症でしばしば致死的な感染症を起こすもの。	

- ・ 記載があいまいな表現を具体的に欄外に記載
- ・ 基準を追加  
(心臓病変のみからの病原菌分離時)
- ・ 文言の整理

# 「措置」のポイント

## 措置

- (1) 生体検査時:と殺禁止【と畜場法第16条、施行規則第16条第1項(別表第4)】
- (2) 解体後検査時:全部廃棄【と畜場法第16条、施行規則第16条第3項(別表第5の上欄)】

- ・ 解体前検査時は判定基準がないため未記載

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Pascoe B, Lappin-Scott H, Sheppard S K, <u>Asakura H</u>	Does biofilm formation aid colonization and infection in <i>Campylobacter</i> ?	Sheppard SK & Meric G	<i>Campylobacter</i> Ecology and Evolution	Caister Academic Press	London, UK	2014	pp. 177-188

