

ISSN 0388-9335

山口獣医学雑誌

第 49 号
2022年12月

山口県獣医学会

THE YAMAGUCHI JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

No. 49

December 2022

THE
YAMAGUCHI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION

山 口 県 獣 医 学 会

編 集 委 員 会

野村 恭晴 奥田 優 谷 健二

下田 宙 度会 雅久* 柳澤 郁成

(ABC順：*編集委員長)

寄 稿 者 へ

山口獣医学雑誌は、山口県獣医学会の機関誌として、毎年1回発行される。雑誌は、獣医学と関連領域のすべての問題について、原著、総説、短報、記録および資料、等々を掲載する。

原稿は、正確に書かれた日本文、英文のいずれでも受理するが、この場合、日本文原稿には英文要約を、英文原稿には日本文要約を添付すること。

原稿は、郵便番号 754-0002 山口県山口市小郡下郷1080-3、山口県獣医師会館内、山口県獣医学会事務局あてに送付すること。

THE YAMAGUCHI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION

EDITORIAL COMMITTEE

Yasuharu NOMURA Masaru OKUDA Kenji TANI

Hiroshi SHIMODA Masahisa WATARAI* Fuminori YANAGISAWA

(in alphabetical order: *Editor in chief)

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine is published annually by the Yamaguchi Veterinary Medical Association. The Journal provides original articles, reviews, notes, reports, and materials, which deal with all aspects of veterinary medicine and related fields. *The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine* assumes no responsibility for statements made by authors or other contributors.

NOTES TO CONTRIBUTORS

Manuscripts written in Japanese or English are accepted. The manuscripts in Japanese should be accompanied by summaries in English. All the manuscripts should be sent to the Editorial Office : *The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine*, The Yamaguchi Veterinary Medical Association, 1080 - 3, Ogorishimogo, Yamaguchi - shi, Yamaguchi - ken 754 - 0002, Japan

山口獣医学雑誌 第49号 2022年

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine No.49 December 2022

目 次

総 説

Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)

豊福 肇..... 1～10

原 著

牛糞便由来EHECの血清型および病原性関連遺伝子に関する研究

渡邊健太・西中間菜穂・清田寛子・水間なつみ・度会雅久.....11～18

大規模肉用牛農場で発生した牛呼吸器病症候群とその対策

大山ゆき・亀山光博.....19～24

症 例

胆嚢粘液嚢腫を疑った粘液産生性胆管癌の猫の1例

原口友也・下ノ原 望・大草朋子・伊藤嵩人・辻 可奈子

板本朗代・脇本美保・山下祐里・壹岐 茜・沖汐 恵・新田直正.....25～30

資 料

子牛の中耳炎に対するデジタルレントゲンを用いた撮影方向の検討

藤原優美・竹山哲矢・國貞宥妃・外川智周・田浦保穂・佐々木直樹31～36

The table of contents in English may be found on the back cover.

総 説

Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)

豊福肇

[2022年12月20日受付・2023年1月20日受理]

REVIEW

Hazard Analysis and Critical Control Point

Hajime TOYOFUKU

1) *Department of Veterinary Medicine, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi, 753-8515, Japan*

2) *The United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University, Yamaguchi, 753-8515, Japan*

和文抄録

Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) とは、食品等事業者自らが原材料及び製造工程で発生し、最終製品を喫食した際に健康被害を起こす可能性のある危害要因（ハザード）の中から、重要なハザードを特定した上で、原材料の入荷から製品の出荷に至る全工程の中で、それらの重要なハザードを除去又は許容レベルまで低減させるために特に重要な工程（CCP）を特定した上で、それを管理し、管理が不適切な場合には改善措置を講じることで、製品の安全性を確保しようとする食品安全上のツールである。HACCPによる衛生管理は国際的には普及がすすんでいる。日本では2021年6月から、原則としてすべての食品事業者がHACCPに沿った衛生管理が制度化された。本稿では、日本でのこれまでのHACCPと食品衛生の歴史について振り返った。

キーワード：HACCP, Codex

ABSTRACT

Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) is a food safety tool that food business operators themselves identify significant hazards in raw materials and manufacturing processes and that may cause adverse health effects when eating the final product and cannot be controlled by implementing General Hygiene Practice, identify Critical Control Point(s) to eliminate or reduce those significant hazards in an acceptable levels in all processes from the arrival of raw materials to the shipment of products, monitoring the control of CCP, taking corrective measures when control of CCP is inappropriate, and ensures product safety. In Japan, from June 2021, in principle, food safety management in line with HACCP has been mandatory for all food business operators. This article reviews the history of HACCP and food hygiene in Japan.

Key words: HACCP, Codex

1) 山口大学共同獣医学部獣医疫学教室

2) 山口大学大学院連合獣医学研究科

連絡責任者：豊福肇 山口大学共同獣医学部

〒753-8515 山口市吉田1677-1 TEL：+81 083-933-5827 FAX：+81 083-933-5920

E-mail：toyofuku@yamaguchi-u.ac.jp

はじめに

HACCPは食品事業者自らが、食中毒菌汚染等のハザード（危害要因）のなかから、一般衛生管理を実施してもコントロールできない重要な（significant）ハザードとそれに対する管理手段をHazard Analysisした上で特定し、原材入荷から製品出荷までの全工程の中で、重要な危害要因を除去又は許容れきるレベルまで低減させるために特に重要な工程（Critical Control Point）を特定し、管理し、製品の安全性を確保する衛生管理手法である。HACCPは重要なハザードの管理に焦点を当てて、監査可能（auditable）であるため、世界中で普及している。

本稿はHACCPに関する総説というよりは、30年以上HACCPにかかわってきた筆者の関与、想い、などをつづったエッセイのようなものとお考えいただければ幸いである。

1. 総合衛生管理製造過程の制度（マル総）前

1) 最初のHACCPトレーニング

1992年にアメリカのAmerican Meat Instituteが開催したHACCPの3日間講習会にアメリカの食肉製品製造業者の品質管理の人たちと一緒に参加し、初めてHACCPに触れた。ハザード分析の演習等、今でもHACCPの導入研修で行われているものに近かった。受講後の印象はこれなら日本でもできるなと感じた。

2) CanadaのFSEP

1993年、カナダでの学会発表をお手伝いする機会があり、カナダに行った際、学会で知り合ったCanadian Food Inspection Agencyの方からカナダの任意の手上げ方式の認証制度であるFood Safety Enhancement Program (FSEP)のHACCP及びPRPのマニュアルを入手し、それらを食品衛生研究に紹介した。そのとき、はじめてPre-requisite Program (PRP: 前提条件プログラム)の概念を紹介され、HACCPとPRPの両方が食品の安全確保には必要であることを教わった。日本で最初にPPと言いついたのは私である。この時入手した資料はその後の日本のマル総の審査制度の参考にさせてもらった。^{4)~5)}

3) HACCP研究班

厚生科学研究の班のひとつで、Codexの食品衛生の一般原則（以下GPFH）のHACCP適用のためのガイドラインを読んで理解し、主要用語の日本語訳を決め、解釈する作業を熊谷先生、小久保先生、小沼先生と私で行った。その成果は食品衛生学雑誌等に報告した。^{4)~5)}

4) EU輸出禁止事件

EU域内に輸出される水産食品については、その加工場等がEUの定めた要件に適合しなければならないこととされ、1995年3月の欧州委員会の担当官による我が国の水産食品加工場への査察の結果、EUの要件に適合していないとして、同年4月7日から日本産水産食品の全面輸入禁止措置が

とられた。適合していない理由のひとつがHACCPプランを作成し、実施していないというものであった。

当時、厚生省の乳肉衛生課は大騒ぎになり、国立公衆衛生院にいた私は、課長がヨーロッパに交渉及び根回しに行く際のお供がいないということで、急に呼び出され、乳肉衛生課長と水産省の加工課長の欧州委員会及び関連国の支援取り付けの旅に随行した。また、その後、欧州委員会のイタリア人獣医の査察官が、デンマークの水産加工施設で実際の査察のやり方を見せてやるから見に来いというので、当時の乳肉衛生課の課長補佐、青森県と北海道の担当課の課長補佐と一緒に彼の監査を見せてもらった。彼はGood Hygiene Practice (GHP)の化身のような人で、一見きれいな施設にあっても製品がprotectされているか、原材料の受け入れ場所は汚染から守られているか、生の原材料と包装直前の最終製品の間には交差汚染の可能性はないかな等を細かく見て指摘していたのは今でも覚えている。

その後、欧州委員会との協議を踏まえ、厚生省（当時）はHACCPの要求事項を含む「対EU輸出水産食品取扱要領」を改正した。当時大手水産食品業者と実際に輸出をしている企業のなかから、欧州委員会の要求事項を満たせる施設を5、6施設選定し、欧州委員会の査察官による再度の査察の結果、1995年12月6日に日本産水産食品の輸入が解禁されることとなった。

2. マル総

1995年、HACCPによる衛生管理を食品衛生法に位置づけ、一律の製造基準によらず、工程の各段階において安全性に配慮した多様な方法による食品製造を可能とする総合衛生管理製造過程の制度（以下、マル総という。）が新設された。対象食品は1996年5月に乳（牛乳、山羊乳、脱脂乳及び加工乳）、乳製品（クリーム、アイスクリーム、無糖練乳、無糖脱脂練乳、発酵乳、乳酸菌飲料及

び乳飲料), 食肉製品 (ハム, ソーセージ, ベーコン等), 1997 年 3 月に容器包装詰加圧加熱食品, 1997 年 11 月に魚肉練り製品 (魚肉ハム, 魚肉ソーセージ, 鯨肉ベーコン等), 平成 1999 年 7 月に清涼飲料水, 2003 年 6 月に乳製品 (脱脂粉乳) と拡大されたが, 製造基準の適用除外という性格上, 製造基準のある製品にしか適用できないという限界があった。

食品衛生法に HACCP の考え方を導入したのは当時の厚生省の獣医の幹部の意地と根性と法律事務官の知恵なのだろうと思う。Codex の GPFH に HACCP 付属文書が最終採択される前に食品衛生法に HACCP を入れたというのは今考えると, cool なことだと思う。今のように義務化は難しい。ならば製造基準の適用除外の条件を HACCP としつつ, 製造基準のままでも認定を取得できるとして, HACCP の普及を図った点はすごい知恵だと思う。当時の乳肉衛生課が関係の深かった乳業界と食肉製品製造業界からは始めるため, この 2 食品を最初の承認対象とした。両業界とも大手トップ企業の品質保証の幹部によるマニュアル作成の検討会が開催され, マニュアルが出版された。当時私は両方の検討会に参加していた。

当時の乳肉衛生課は対米食肉輸出, 対 EU 水産輸出を通じて, 米国農務省食品安全検査, 欧州委員会による査察を経験して, HACCP もそうだが GHP の重要性和日本の弱点が GHP にあることを認識していた。それで, マル総は GHP と HACCP の両方を承認対象にした。輸出施設レベルの GHP のハードを求めたわけではないが, それでもマル総のためには一定程度のハードが必要という印象と HACCP は大手企業のためのものという印象を持たれてしまったことは残念である。筆者は法律改正時にはまだ公衆衛生院にいたが, 施行時には乳肉衛生課に異動し, どのような現地査察を行うか監視チェックリストを作成するのに関与し, また実際の監視チームをリードした。当時は地方厚生局がなかったため, 乳肉衛生課内に査察チームが作られ, 月曜に出張し, ブロックごとに 3, 4 施設を近隣自治体の食品衛生監視員の方々にも承認を求める施設の査察に同行してもらい, 我々がどういう視点で査察をするのかを見てもらい, 金曜に厚生省に戻って, それから各チームの今週の監査結果の報告会を土曜の始発電車が動き出すまでやっていた。厚生省の査察チームは施設に朝から晩まで滞在して, HACCP7 原則 12 手順の実施状況を監視し, フローダイアグラムの現場確認, 監査チームのハザード分析と施設のハザード分析と比較し, 違いがあれば施設と議論す

る, CCP の設定, Critical Limit (以下「CL」という。) の設定根拠及びモニタリングの方法や頻度についても施設と我々の考えたものを比較した。また, モニタリングや改善措置を施設の従業員が実施しているところを観察し, 質問をし, モニタリング, 改善措置及び検証記録についても現場及び保管されている記録を見直し, CL からの逸脱を見逃していないか, モニタリングは HACCP プランで規定された方法や頻度で行われているか, CL から逸脱したときには改善措置は HACCP プランに沿って行われていたか, また記録の確認は決められた方法と頻度で行われているか等 HACCP プランの実施状態について細かくチェックした。自治体の監視員の方々は厚生省の監査チームがそこまでやるとは思っていなかったと後で自治体の方から聞いた記憶がある。

ここで, ちょっと世界の状況を振り返ってみたい。

Codex の食品衛生部会 (以下, CCFH という。) は 1989 年の第 24 回部会において, HACCP は消費者の保護に非常に有益なツールであり, Codex 委員会を通じて普及すべき, そのためには国際的に合意できる定義と原則を作成すべきということで, CCFH 内に作業部会を設けて議論することに合意した。1991 年の第 25 回 CCFH は, 第 24 回で設立された WG の勧告を受け入れ, HACCP 適用のための原則は食品衛生の一般原則に付属文書として追加することを決定した。この文書で 7 原則 12 手順が初めて明らかになった。作業部会の報告書に対する各国からのコメントを求めため, Step3 で回覧することに合意した。1993 年の第 26 回 CCFH で HACCP 適用のためのガイドラインが合意され, 次の総会にステップ 6, 7 を省略して最終採択するように勧告した。しかし, 第 20 回の総会では, HACCP 適用のためのガイドラインは GPFH の付属文書とすることに合意し, 1994 年の第 27 回 CCFH でさらに議論することを求め, CCFH は議論の結果, GPFH と HACCP 付属文書を Step5 に進めることに合意した。その後 1996 年の第 29 回 CCFH では HACCP 適用における弾力性が追加され, 次の総会において Step8 として採択するように勧告した。1997 年の第 22 回総会で GPGH と HACCP 付属文書は最終採択された。

3. 食品の製造過程の管理の高度化に関する臨時措置法〔通称 HACCP 支援法〕(平成 10 年法律第 59 号)

食品の安全性の向上と品質管理の徹底に対する社会的な要請に対応し, 食品製造業界全体に

HACCP の導入を促進するための法律であった。HACCP 導入に必要な施設整備や、その前段階の衛生・品質管理等のための施設及び体制の整備である「高度化基盤整備」に対する(株)日本政策金融公庫による長期融資支援を行った。

この法律は厚労省と農林水産省の共管なので、筆者は法案の各省協議、法務省への説明等に厚労省代表として参加した。なぜか分からないが、各省協議で当時の通産省にいじめられた記憶がある。この法律ができる前、マル総があるため、厚生省は従来の衛生管理と HACCP による衛生管理は同等であるというスタンスであったが、話している本人が HACCP による衛生管理のほうが優れていると考えているものだから、だんだん、ぼろが出てきて、HACCP による衛生管理のほうが優れているという雰囲気になっていった記憶がある。

4. 対米水産食品輸出

EU に水産食品輸出を止められた苦い経験を踏まえ、米国 Food and Drug Administration(以下、[FDA] という。)が水産食品に対する HACCP の導入に関する連邦規則を 1997 年 12 月 18 日から施行し、この規則が我が国から米国へ輸出される水産食品に対しても適用されることから、その取扱いについて厚生省(当時)は 1997 年 12 月に「対米輸出水産食品の取扱い要領」を定め、対米輸出水産施設は厚労省が直接監視する枠組を作成した。⁶⁾

その後、USFDA の水産食品 HACCP の監視員向け監視員講習会を受講させてもらい、またその模様を録画したビデオテープも入手した。これを白金台の国立公衆衛生院の階段講堂で、全国の食品衛生監視員に対してライブ吹替で上映し、実習を行った。この VHS ビデオ 4 本セットは日本語吹き替え版が 2 年後に日本食品衛生協会から出版されたが、現在は廃盤となっている。内容は講義とハザード分析、モニタリングから記録、Sanitation Standard Operation Program (SSOP) モニタリングまでを 4 つのセクションに分け、適切に実施している施設と問題のある施設を FDA の各地域事務所に勤務している監視員が監視した動画を見た後に、演習課題に取り組み、その結果をワシントン DC から全米の FDA のオフィスに電話して、検討結果を発表させ、その結果について FDA の本部の監視員が批評した後、質疑応答が行われる内容であった。HACCP ベースの監視をビデオにしたという点では画期的で、かつ今でも唯一のもので、私が国立保健医療科学院で監視指

導コースの担任の先生をやっていた時代は、このビデオを見て自習してくることを受講の前提にしていたが、種々の事情で事前受講してこれなかった受講生のため、“朝練”と称して、講義前に毎日 1 時間、一週間かけてビデオを見て、演習をしてもらい、研修の前提条件として予習して頂いた。

5. アメリカ HACCP 留学

1998 年 7 月から 1 年間、USFDA の Office of Seafood に在籍させてもらって、Seafood HACCP の施行状況をワシントン DC の HQ、ボストン、シアトル、モービル及びニューヨークの地域事務所において、FDA 監視員による水産加工施設の HACCP 監視に同行させてもらい、Hazards and Controls Guide (以下 HC ガイド)を用いて、FDA の監視員がどのように施設の HACCP プランについてアドバイスをし、また問題がある場合には事務所に戻って警告書を作成するところを見せてもらった。FDA の Office of Seafood においては、問題対応や会議対応の政策検討の生々しい議論をオープンにみせてもらえた。また、モービルの事務所では、カニを茹でて、冷却し、むき身にして包装する施設の作業時間に合わせて、日中及び夜中の監視にも同行し、実際の作業におけるハザードの管理の実際を監視指導する現場を見せて頂いた。シアトルでは日系の FDA 監視員とともに、冷温燻製する魚の工場の HACCP プランのチェックに同行し、HC ガイドの内容を実際の HACCP プランにどのように反映するのかを議論したのを記憶している。Seafood HACCP の HC ガイドは魚種別に考慮すべきハザードと製造工程由来で考慮すべきハザードを表で列挙し、そのハザードごとに、管理手段、Critical limits、モニタリング方法、改善措置の候補を示している画期的なガイドであり、年々少しずつ更新されており、今でもこれを超えるガイドラインは出版されていない。^{7) から 8)}

6. HACCP から離れていた時期

1999 年 10 月から 5 年間、WHO の食品安全部に派遣され、FAO/WHO の実施する微生物リスク評価の事務局員として 2000 年の Joint Expert Meeting on Microbiological Risk Assessment (JEMRA) の立ち上げに参加できた。確率論的微生物リスク評価のトレーニングの 2 週間コースを受講したが、その時はなんとなくわかったような気になるが HACCP のトレーニングと違い、数学の基礎知識とほぼ毎日エクセルに数式を打ち込む練習をしていないとすぐ忘れしまい、リスク評価

モデルを読むことはできるが、作成するまでにはなれなかった。

JEMRA はすでに誕生から 20 歳を迎えており、CCFH からの科学的アドバイスの求めに応じ、色々なタイプの科学的アドバイスやリスク評価結果を提供している。⁹⁾

この間に Codex は 2003 年の第 35 回 CCFH において小規模事業者への弾力的な適用をすすめるために HACCP システム適用のためのガイドラインを修正し、2004 年の第 26 回 Codex 総会で採択された。(FAO/WHO 第 35 回 CCFH 報告書 2003 年 ALINORM 03/13A) また、この時に中小食品事業者が HACCP に取り組む際に障壁があるとの懸念が示され、これに取り組むための指針として、FAO/WHO が “Obstacles to the Application of HACCP, Particularly in Small and Less Developed Businesses, and Approaches to Overcome Them” が出版された。

7. 制度化に向けて

2019 年食品衛生法等の一部改正により、HACCP に沿った衛生管理が制度化された。2021 年 6 月 1 日に完全施行された。¹⁰⁾

制度化では食品事業者は以下のことを実施しなければならない。

- ① 「一般的な衛生管理」及び「HACCP に沿った衛生管理」に関する基準に基づき衛生管理計画を作成し、従業員に周知徹底を図る
- ② 必要に応じて、清掃・洗浄・消毒や食品の取扱い等について具体的な方法を定めた手順書を作成する
- ③ 衛生管理の実施状況を記録し、保存する
- ④ 衛生管理計画及び手順書の効果を定期的に（及び工程に変更が生じた際等に）検証し（振り返り）、必要に応じて内容を見直す

食品衛生上の危害の発生を防止するために特に重要な工程を管理するための取組（HACCP に基づく衛生管理）を Codex のガイドラインに基づき自ら作成する “HACCP に基づく衛生管理” と、取り扱う食品の特性等に応じた取組（HACCP の考え方を取り入れた衛生管理）として業界団体が作成し厚生省の技術研究会で確認された手引きを参考に、簡略化されたアプローチによる衛生管理を行う “HACCP の考え方を取り入れた衛生管理” がある（小規模事業者等）。これらをあわせて “HACCP に沿った衛生管理” という。

8. 制度化前後の国際的な動き

2013 年 11 月の第 45 回 CCFH において、フィンランドの Sebastian Helm 氏（獣医）が GPFH と HACCP 付属文書の見直しを見据えて 2014 年にフィンランドで関心のある専門家を集めて会議をすると発言し、2014 年から見直しの議論が始まった。2019 年の第 51 回 CCFH において、GPFH と HACCP Annex の CCFH での改訂作業が完了し、(Step 5/8 で総会での採択を勧告)、2020 年第 43 回 Codex 総会で、採択された。¹¹⁾ 筆者はこの過程すべてに参加し、日本の立場を表面しつつ、より良いガイドライン作成に貢献した。”

1) 構造上の変化

イントロダクションと共通部分の後、第 1 章として GHP（一般衛生管理）、第 2 章として HACCP システム及びその適用のためのガイドラインが続いている。

2) 主な変更点

- 食品安全へのマネジメントコミットメント〔食品安全文化を含む（下記 4）参照〕が導入された。
- 一般衛生管理と CCP の関係性が明確になった。
- すべての食品事業者（以下 FBO という。）は、自分が製造・加工・販売する食品に影響するハザードを認識する必要あり、FBOs はハザードの消費者の健康への影響を理解したうえで、それを適切に管理すべきある、としたこと。
- HACCP の定義がなくなり、
 - HACCP Plan：食品ビジネスにおいて重要なハザードのコントロールを保証するため HACCP の原則に従って作成された文書（文書のセット）
 - HACCP System：HACCP プランの作成、および当該プランに従って手順を実施することが示された。
- Significant hazard の定義が新設された：ハザード分析によって特定されるハザードで、コントロールのない状態では、許容できないレベルまで発生することが合理的に考えられ、食品の意図する用途のため、そのコントロールが必須なハザード
- Food Hygiene System（GHP と HACCP をあわせた概念）という言葉が創設された。
- 共通部分に一般原則が新設された。（下記

3) 参照)

- GHP requires Greater Attention の概念が導入された。
- GHP の“操作のコントロール”に製品及びプロセスの記述, GHP の効果に対する考慮, GHP のモニタリング及び改善措置, 検証並びにアレルゲン管理が追加された。
- HACCP についてはハザード分析の重要性, 及びハザード分析では重要なハザードを特定することをハイライトした。
- 原則 6 に妥当性確認と検証のサブセクションを設けた。
- 原則 3 を“妥当性確認された CL の設定”とした。
- GHP の管理措置と CCP の管理措置の対比表を作成した。

3) 共通事項：一般原則

- 食品安全及び適切性は, 科学に基づく予防的アプローチ (例, 食品衛生システム) を用いてコントロールすべきである。GHP は汚染物質の存在を最小にできる環境で製造及び取り扱われることを保証すべきである。
- 適切に適用された PRP (GHP を含む) は効果的な HACCP システムの土台を提供する。
- 各食品事業者 (以下, 「FBO」という) は原材料, その他の原材料, 製品, 調理工程, 食品が製造または取り扱われる環境, に関連するハザードを認識すべきである。
- 食品, 食品プロセスの性質, 可能性のある健康に対する悪影響によっては, ハザードをコントロールするのに GHP (GHP with Greater Attention) の適用で十分である。GHP の適用だけでは不十分な時には, GHP と CCP における管理手段の組合せを適用すべきである。
- 許容される食品安全レベルを達成するのに必須の管理手段は, 科学的に妥当性確認されるべきである。
- 管理手段の適用は食品の性質及び事業のサイズに応じて, モニタリング, 改善措置, 検証および文書化の対象となる。
- 食品衛生システムが, 修正が必要かどうかを決めるためにレビューすべきである。これは定期的に, また食品事業に関連して, ハザードまたは管理手段に影響しうる重要な変更 (新規工程, 新原材料, 新規製品,

新しい装置, 新しい科学的知見等) が生じた都度実施されねばならない。

- フードチェーン全体を通じて, 食品安全と適切性を保証するため, すべての関係者と, 食品及び食品プロセスに関する適切なコミュニケーションを維持すべきである。

4) 食品安全文化

食品安全文化を育てるには以下のエレメントが重要である。

- 安全な食品の生産及び取扱いにマネジメント及びすべての従事者がコミットメントする。
- 正しい方向性をセットするリーダーシップ及び食品の安全な取扱いにすべての従事者が関与する。
- 食品事業のすべての従事者が食品衛生の重要性を認識する。
- 食品事業のすべての従事者の間で, オープンで, 明確なコミュニケーション (逸脱及び期待に関するコミュニケーションを含む) を行う。
- 食品衛生システムの効果的な機能を保証するための十分なリソースがあること。

5) 共通部分になる重要な概念

共通部分の第4～第7段落に今回の改訂のなかでも重要な概念が紹介されている。

第4. FBO は食品に影響するハザードを認識する必要あり。FBOs はハザードの消費者の健康への影響を理解し, それを適切に管理すべき。Good Hygiene Practices (GHPs) はそのビジネスに関連するハザードを効果的にコントロールする土台を提供すべき。FBOs のなかには効果的な GHP の実施が食品安全を取り組むのに十分な場合もある。

第5. 食品安全に取り組むうえで実施する GHP が十分か, 特定されたハザードをどのようにコントロールするかはハザード分析を通じて決定することができる。しかし, 全ての FBOs にこれを行う専門的知識があることはない。もし, FBO がハザード分析を行えない場合, その FBO は外部のソース (規制機関, 学会, または業界団体等) が作成した, 適切なハザードの特定とそのコントロールに基づく, 適切な食品安全規範に関する情報に依存することができる。例えば, 安全な食品を生産するための規制の要求事項は, しばしば規制機関が実施したハザード分析に基づき作成されている。同様に業

界団体が作成した食品安全手順を記述したガイダンス文書は、特定のタイプの製品のハザードとコントロールに関する知識を有する専門家が実施したハザード分析に基づいている。外部作成の generic ガイダンスを用いる場合、FBO はガイダンスが自施設の活動に対応しているか、全ての関連するハザードがコントロールされているか、保証すべきである。

第6. 全てのGHPは重要でも、いくつかのGHPsは食品安全上より大きなインパクトがある。従って、いくつかのGHPは食品に関する安全性の懸念に基づき、安全な食品を提供するために、大きな注意 (greater attention) が必要かもしれない。例えば、調理済み食品に直接接触する器具や作業台表面は、壁や天井の清掃より greater attention が必要である。なぜなら食品接触表面が適切に洗浄されていない場合、その食品の直接汚染につながるからである。Greater attention にはモニタリングや検証の頻度を上げることが含まれる。

第7. ある状況では、食品操作の複雑さ、製品及び工程に関連するハザード、技術の進歩 (例：ガス置換包装による賞味期限の延長)、製品の使用方法 (例：特定のダイエット目的の製品) によっては、GHPの実施だけでは食品安全を保証するには十分でないこともある。そのような場合、ハザード分析を通じてGHPによってコントロールされない重要なハザードが特定されれば、そのハザードはHACCPプランで取り組むべきである。

6) HACCPにおける主な変更点

- ・ハザード分析の重要性が強調され、3ステップ
 - 1) 潜在的なハザードの列挙、
 - 2) HACCPプランで取り組むべき重要なハザードの絞り込み、
 - 3) 重要なハザードに対する管理手段の特定であることが明確になった。

- ・CLは妥当性確認されていなければならないことが明確にされた

- ・妥当性確認とは、HACCPプランの有効性の挙証であり、HACCPプランの通りに安全管理が行われれば、安全な最終製品が提供できるというエビデンスを得ることである。

HACCPプランの有効性の挙証

(プラン通りに行えば、安全な製品が提供できるか)

HACCPプランが実施される前に、その妥当性確認が必要；これは以下の要素が一緒になって、食品事業にとって適切な重要なハザードをコント

ロールする能力があることを保証すること：

- ハザードの特定、
- CCP
- CL
- 管理手段
- CCPモニタリングの頻度とタイプ、
- 改善措置
- 検証の頻度及びタイプ及び記録すべき情報のタイプ
- 管理手段及びそのCLの妥当性確認はHACCPプランの作成中に行われる。妥当性確認は科学的文献のレビュー、数学的モデルの使用、妥当性確認研究の実施、及び/又は権威あるソースが作成したガイダンス資料を使用することが含まれる。
- CLを設定するのにHACCPチームではなく、外部の専門家が作成したHACCPガイダンスを使用する場合、検討中のオペレーション、製品または製品群にそのCLが適用できるか注意が必要である。
- HACCPシステムの最初の実施の間及び検証手順が設定された後、製造条件下で製造中に、一貫性をもってコントロールが達成できたことを実証するエビデンスを入手すべきである。
- 食品安全に影響を与える可能性のある如何なる変更もHACCPシステムのレビューが必要で、かつ必要な時にはHACCPプランの再妥当性確認が必要

HACCPシステムが実施されたのち、HACCPシステムが効果的に機能していることを確認する手順を設定すること。これらには次の手順が含まれる：

- PRPの実施状況の適合性
- HACCPプランの実施状況及び効果の適合性
- 消費者からの苦情、違反等の見直し (発生の都度)
- CCPにおける管理精度の適合性

CCPの検証には以下が含まれる：

- 記録の確認
 - ・モニタリング記録・改善措置記録等の確認
 - ・改善措置内容のレビュー
- モニタリングの実施状況 (手順等) の確認
- 実地測定
- 製品・仕掛品・原材料の検査

● モニタリング測定機器の校正等々

また、2022年の総会において新しい CCP decision tree (以下、DT という。) が採択された。2003年の第35回 CCFH での HACCP ガイドラインの改訂は、WHO の JEMRA 事務局員として参加していたが、出向していた WHO の食品安全部内

では HACCP 担当ではなかったもので、正直そんなに思い入れはなかった。しかし、今回の改訂はフィンランドの会議からすべての作業部会及び CCFH の部会での議論に参加し、日本の食品衛生法の改正にできるだけ齟齬がないように、主張してきたので、Codex2020 は日本の食品衛生法の HACCP 制度化と一致していると言える。

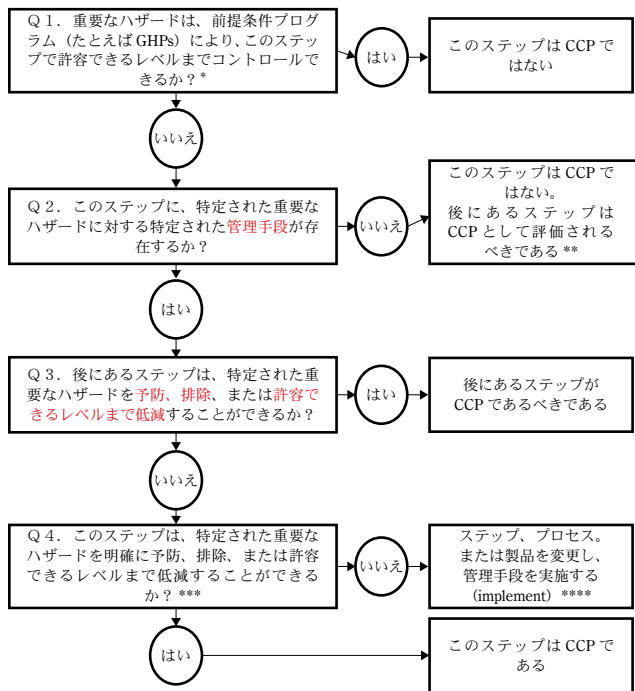


図 1 CCP 決定のための Decision Tree

Codex2022

A.1. DT の例—特定の重要なハザードが特定されたステップに適用する

※ハザードの重要性 (つまり、コントロールがなかった場合の起こりやすさとハザードによる影響の重篤性) と、GHPs などの前提条件プログラムにより十分にコントロールできるかどうかを考慮する。GHPs は、日常的な (routine) な GHPs、またはハザードをコントロールするためにより大きな注意を必要とする GHPs (たとえば、モニタリングや記録) であるかもしれない。

※※質問 2～4 で CCP が特定されない場合、管理手段 (control measure) を実施導入するためにプロセスまたは製品を変更し、新しくハザード分析を実施するべきである。

※※※同じハザードをコントロールするために、別のステップの管理手段と合わせ技で、このステップの管理手段が機能するかどうかを検討する。その場合、両方のステップを CCPs と考えるべきである。

※※※新たにハザード分析をした後、DT の先頭に戻る。

まとめ

HACCP は世界標準の食品安全管理のツールであり、世界各国の食品安全法規のもとになっている。また、筆者が ISO22000 TC17 において議論に参加した ISO22000-2018 の第 8 章も Codex 委員会の HACCP をベースにされている。当然、GFSI でベンチマークされている民間規格 (FSSC22000, JFS-C 等) においても Codex HACCP をベースにしている。さらに、アメリカの食品安全近代化法の人用食品の未然予防措置のように、HACCP の進化系だとしている国もあり、今後も HACCP は進化発展していくことが考えられ、日本もその流れに乗り遅れないようにしなければならない。

参考文献

- 1) 熊谷進・小沼博隆・小久保彌太郎・豊福 肇：危害分析重要管理点 (HACCP) システムによる食品の衛生管理：危害分析と重要管理点。食品衛生研究, 45(8)：23-40. 1995.
- 2) 熊谷進・小沼博隆・小久保彌太郎・豊福 肇：危害分析重要管理点 (HACCP) システムによる食品の衛生管理。食品衛生学雑誌, 37(1)：J1-7. 1996

- 3) 豊福肇：カナダ農務省の食品の安全性強化プログラムについて（その1）. 食品衛生研究, 44(4)：47-65. 1994.
- 4) 豊福肇：カナダ農務省の食品の安全性強化プログラムについて（その2）. 食品衛生研究, 44(5)：59-76. 1994.
- 5) 豊福肇：カナダ農務省の食品の安全性強化プログラムについて（その3）. 食品衛生研究, 44(12)：29-70. 1994.
- 6) 豊福肇：米国 FDA による水産食品 HACCP 規則発表について. 食品衛生研究, 46(3)：17-38. 1996.
- 7) 豊福肇：米国 FDA による HACCP の取組み (1). 食品衛生研究, 49(5)：15-26. 1999.
- 8) 豊福肇：米国 FDA による HACCP の取組み (2). 食品衛生研究, 49(6)：31-43. 1999.
- 9) 豊福肇：WHO 食品安全部より. 食品衛生学雑誌, 44(6)：357. 2003.
- 10) 豊福肇：HACCP 義務化における現状と課題. 特集：「食品衛生と栄養」. 栄養, 35(3)：127-135. 2020.
- 11) 豊福肇：コーデックス委員会の食品衛生の一般原則の改訂について. 食品衛生研究, 71(5)：35-50. 2021.

原 著

牛糞便由来 EHEC の血清型および病原性関連遺伝子に関する研究

渡邊健太¹⁾ 西中間菜穂¹⁾ 清田寛子¹⁾ 水間なつみ²⁾ 度会雅久¹⁾

[2022年11月29日受付・2022年12月15日受理]

ORIGINAL ARTICLE

Research on serotypes and pathogenicity-related genes in EHEC from bovine feces

Kenta WATANABE¹⁾, Nao NISHINAKAMA¹⁾, Hiroko KIYOTA¹⁾,
Natsumi MIZUMA²⁾, and Masahisa WATARAI¹⁾,

要 約

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC) は、ヒトに感染し下痢を引き起こす下痢性大腸菌の一つである。経口感染による食中毒として発生する場合は最も多く、重篤化した場合には死に至る。牛をはじめとした家畜が保菌動物であるとされており、その糞便等が汚染源となる。そこで本研究では、牛糞便から EHEC を分離し、各病原性関連遺伝子の保有状況ならびに血清型に関する遺伝学的な調査を行った。分離された EHEC 128 株中、*stx1* および *stx2* の陽性率はそれぞれ 52.3% (67/128)、12.5% (16/128) であり、特に両方の遺伝子を保有する株の比率は 6.3% (8/128) であった。また、*eae* の陽性率は 86.7% (111/128) であった。*stx1* のみを単独で保有する株は分離されず、*stx1* 陽性株は全て *eae* を保有しているという特徴が認められた。さらに、分離株の血清型を同定するため、EHEC の主要な O 血清型である O26, O103, O111, O121, O145, O157, O165 を同時に判別できるマルチプレックス PCR を行った。結果、12 株が O26 と判別されたが、O157 を含め、その他の血清型はいずれも認められなかった。O26 と判別された株の全てが *stx1* および *eae* 陽性であった。近年、O26 による感染事例数は増加傾向にあることから、牛糞便中における O26 を対象とした疫学的な調査を重ね、その結果を注視していく必要があると考える。

キーワード：EHEC, 牛糞便, 血清型, RAPD 法

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is one of the pathogenic *E. coli* strains that infect humans and cause severe diarrhea. EHEC most often occurs as food poisoning following oral ingestion, and in severe cases, infection can lead to death. Domestic animals, including cattle, are considered reservoirs of EHEC, and their feces are a source of contamination. In this study, EHEC was isolated from bovine feces and genetically tested for the prevalence of each pathogenicity-related gene and serotype. Of 128 EHEC isolates, 52.3% (67/128) were positive for *stx1* and 12.5% (16/128) for *stx2*; 6.3% (8/128) were positive for both genes. In comparison, the positivity rate for *eae* was 86.7% (111/128). Additionally, no strains carrying *stx1* alone were isolated, and

1) 山口大学共同獣医学部獣医公衆衛生学教室

2) 農林総合技術センター畜産技術部 家畜改良研究室

連絡責任者：渡邊健太 山口大学共同獣医学部

〒753-8515 山口県山口市吉田1677-1 Tel:083-933-5821 Fax:083-933-5821

E-mail:kwata@yamaguchi-u.ac.jp

all *stx1*-positive strains were identified as carrying *eae*. To identify the serotypes of the isolates, multiplex polymerase chain reaction testing was performed to simultaneously identify the major O serotypes of EHEC: O26, O103, O111, O121, O145, O157, and O165. Twelve isolates were identified as O26, but none of the other serotypes, including O157, were found. All of the strains identified as O26 were positive for both *stx1* and *eae*. Because the number of cases of infection by O26 has been increasing recently, it is necessary to perform additional epidemiological studies on O26 in bovine feces and to carefully monitor the results.

Key words: EHEC, Bovine feces, Serotype, RAPD method

緒 言

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は、ヒトで重篤な出血性の下痢症を引き起こす病原性細菌である。溶血性尿毒症や脳症などの合併症が発症し、重症化した場合には死に至ることから、公衆衛生学的に特に注意が必要な食中毒原因細菌の一つとして注視されている。EHECは数十～数百程度の少量の菌数でも感染が成立するため、ヒトからヒトへの感染、または保菌者から食品への菌の移行により感染が拡大しやすい。無症状病原体保有者も含めると年間約3,000例以上が報告されており、有症者の割合は20歳未満および70歳以上で高いという特徴がある¹⁾。近年においても大規模食中毒事例や死亡事例が報告されている。

一方、EHECは家畜の腸内細菌として存在することが知られており、特に牛をはじめとした反芻動物は主要な保菌宿主であると考えられている。糞便以外にも口腔や体表からもEHECが分離されることが報告されている²⁾。農林水産省が平成19年度に実施した国内の肉用牛を対象とした大規模なEHEC保有状況調査によると、2,436頭のうち、228頭(9.4%)からEHEC(血清型O157およびO26)が分離されている³⁾。生の牛肉の喫食に起因したEHEC集団食中毒事件の発生により生食用食肉の規格基準が改正され、特に生食用牛レバーは提供禁止とするなどの対策が取られているが、前述の通り患者数の根本的な抑制には繋がっておらず、EHEC感染経路の多様性やその制御困難性が示唆されている。EHEC感染数をより低下させるためには、個々の食品に対する規制に限らず、EHEC保菌動物の数を減らすことがその対策の一つになり得ると考えられる。そのためにも、家畜牛を中心とした動物におけるEHEC保有状況を把握することは極めて重要である。

大腸菌の血清型は、O抗原とH抗原の型別の組み合わせによって表現され、多様な血清型が存在することが知られている。我が国におけるEHECに関しては、180を超えるO血清型のうち、EHEC感染患者および保菌者から分離される菌の9割以上がO157、O26、O111などの代表的な血清型によって占められている¹⁾。中でもO157は最も多く、高い病原性と感染力を持つことから、菌分離法や検査・同定法が確立され、その感染予防対策が積極的に行われている。また、牛糞便から分離されるEHECにおいてもO157が占める割合が最も多く⁴⁾、こうした事実からもEHECの汚染源として牛が重要であることが強く示唆されている。

そこで本研究では、牛糞便をサンプルとしたEHECの分離状況と、各毒素遺伝子の保有状況ならびに血清型に関する遺伝学的な調査を行った。

材料と方法

1. 菌分離

2021年11月に山口県内のA農場で飼育されている牛(ホルスタイン種、黒毛和種、および無角和種)16頭より採取した糞便1gを生理食塩水に懸濁し、この遠心上清を段階希釈した後、分離培地であるクロモアガーSTEC培地(関東化学)に塗布し、37°Cで20時間の培養を行った。特徴的な藤色のコロニーが認められたものをEHECと判断し、1サンプルにつき8個のシングルコロニーをランダムに選択し約菌した。

2. PCR

蒸留水を用いてシングルコロニーを懸濁し、これを95°Cで10分間の加熱処理を行った後、15,000rpm、10分間の遠心操作により得られた上清をテンプレートとした。使用した全てのプライマーは表1に示す。PCR用試薬は、KOD-Neoplus(TOYOBO)を使用した。熱処理94°C2分の後、熱変性94°C10秒、アニーリング60°C30秒、伸長68°C30秒の増幅反応を30サイクル実施し、最終伸長68°C5分の条件でPCRを行った。得られた増幅産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動

した後、Ethidium Bromide を用いて染色し、特異的なバンドの有無を確認した。

3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法

RAPD 法については既存の報告に従い実施した⁵⁾。テンプレートは上述した菌懸濁液の上清と同一のものを使用した。RAPD 法で使用したプラ

イマー (random) も表 1 に示す。反応は、94℃ 5 分、35℃ 5 分、72℃ 2 分を 5 サイクル実施した後、94℃ 1 分、40℃ 1 分、72℃ 2 分を 37 サイクル実施した。得られた増幅産物を 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、各株におけるバンドパターンの差異を調べた。

表 1 解析に用いたプライマー一覧。

Primer Name		Sequence (5'-3')	References
<i>stx1</i>	F	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	18
	R	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<i>stx2</i>	F	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	18
	R	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	
<i>eae</i>	F	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	19
	R	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	
O26	F	GGGGGTGGGTACTATATTGG	12
	R	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	
O103	F	TAAGTACGGGGGTGCTTTTT	12
	R	AAGCTCCCGAGCACGTATAA	
O111	F	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	12
	R	AACGCAAGACAAGGCAAAC	
O121	F	CAAATGGGCGTTAATACAGCC	11
	R	TTCCACCCATCCAACCTCTAA	
O145	F	TTCGCGCACAGCATGGTTAT	11
	R	TACAATGCACCGCAAACAGT	
O157	F	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	20
	R	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	
O165	F	GGCGTAAATAAAATATGGGGG	11
	R	GCCCTCTAACAAACGAATTGT	
random		CTGCGATACC	21, 22

結果と考察

牛糞便から分離した EHEC 128 株の遺伝学的性状解析を行った。16 頭から採取された全ての糞便サンプルより EHEC が分離され、その平均値は $4.04 \times 10^5/g$ であった。EHEC の主要毒素遺伝子である *stx1*, *stx2*, 並びに *eae* の保有状況を調べたところ、*stx1* および *stx2* の陽性率はそれぞれ 52.3% (67/128), 12.5% (16/128) であり、特に両方の遺伝子を保有する株の比率は 6.3% (8/128) と低い値であった (表 2)。これに対して、*eae* の陽性率は 86.7% (111/128) と高い値であった。また、*stx1* のみを単独で保有する株

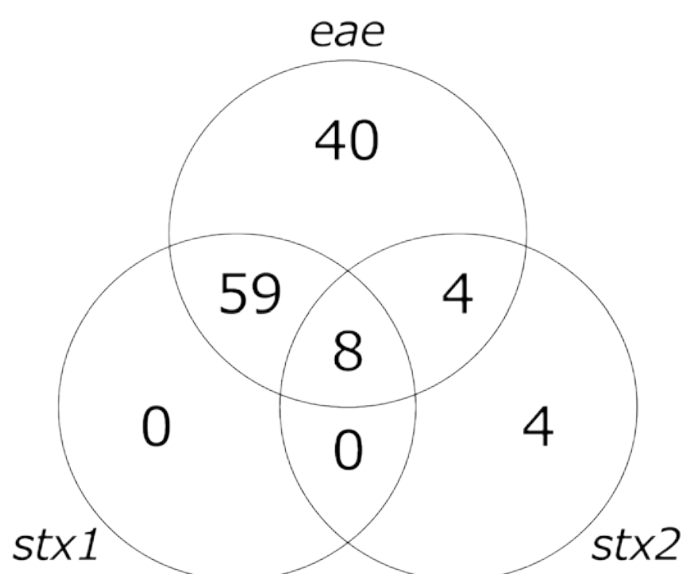
表2 分離株の *stx1*, *stx2*, *eae* 保有状況ならびに血清型. 牛の品種については, *ホルスタイン種, **黒毛和種, ***無角和種をそれぞれ示す.

サンプル 番号	菌株	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	同定された 血清型
1*	1-1	+	-	+	
	1-2	+	-	+	
	1-3	+	-	+	
	1-4	+	-	+	
	1-5	-	-	+	
	1-6	+	-	+	
	1-7	+	-	+	
	1-8	+	-	+	
2*	2-1	+	-	+	
	2-2	+	-	+	
	2-3	+	-	+	
	2-4	+	-	+	
	2-5	+	-	+	
	2-6	+	-	+	
	2-7	+	-	+	
	2-8	+	-	+	
3*	3-1	-	-	+	
	3-2	-	-	+	
	3-3	-	-	+	
	3-4	-	-	+	
	3-5	-	-	+	
	3-6	-	-	+	
	3-7	-	-	+	
	3-8	-	-	+	
4*	4-1	+	+	+	
	4-2	+	+	+	
	4-3	+	+	+	
	4-4	+	+	+	
	4-5	-	-	+	
	4-6	-	-	+	
	4-7	-	-	+	
	4-8	-	-	+	
5*	5-1	+	-	+	
	5-2	+	-	+	
	5-3	+	-	+	
	5-4	+	-	+	
	5-5	+	-	+	
	5-6	+	-	+	
	5-7	+	-	+	
	5-8	+	-	+	
6**	6-1	+	+	+	
	6-2	+	+	+	
	6-3	+	+	+	
	6-4	+	+	+	
	6-5	-	-	+	
	6-6	-	-	+	
	6-7	-	-	+	
	6-8	-	-	+	
7***	7-1	-	-	+	
	7-2	-	-	+	
	7-3	-	-	+	
	7-4	-	-	+	
	7-5	-	-	+	
	7-6	-	-	+	
	7-7	-	-	+	
	7-8	-	-	+	
8**	8-1	-	-	+	O26
	8-2	+	-	+	
	8-3	+	-	+	
	8-4	+	-	+	
	8-5	+	-	+	
	8-6	+	-	+	
	8-7	+	-	+	
	8-8	+	-	+	
9**	9-1	+	-	+	O26
	9-2	+	-	+	O26
	9-3	+	-	+	O26
	9-4	+	-	+	O26
	9-5	+	-	+	O26
	9-6	+	-	+	O26
	9-7	+	-	+	O26
	9-8	+	-	+	O26
10**	10-1	+	-	+	O26
	10-2	+	-	+	O26
	10-3	+	-	+	O26
	10-4	+	-	+	O26
	10-5	+	-	+	O26
	10-6	+	-	+	O26
	10-7	+	-	+	O26
	10-8	+	-	+	O26
11**	11-1	+	-	+	O26
	11-2	+	-	+	
	11-3	+	-	+	O26
	11-4	+	-	+	
	11-5	+	-	+	O26
	11-6	-	-	+	
	11-7	-	-	+	
	11-8	-	-	+	
12**	12-1	-	+	-	
	12-2	-	+	-	
	12-3	-	+	-	
	12-4	-	+	-	
	12-5	-	-	-	
	12-6	-	-	-	
	12-7	-	-	-	
	12-8	-	-	-	
13**	13-1	-	+	+	
	13-2	-	+	+	
	13-3	-	+	+	
	13-4	-	+	+	
	13-5	+	-	+	
	13-6	+	-	+	
	13-7	+	-	+	
	13-8	+	-	+	
14**	14-1	-	-	+	
	14-2	-	-	+	
	14-3	-	-	+	
	14-4	-	-	-	
	14-5	+	-	+	
	14-6	+	-	+	
	14-7	+	-	+	
	14-8	+	-	+	
15**	15-1	-	-	+	
	15-2	-	-	+	
	15-3	-	-	+	
	15-4	-	-	+	
	15-5	-	-	+	
	15-6	-	-	+	
	15-7	-	-	+	
	15-8	-	-	+	
16**	16-1	-	-	-	
	16-2	-	-	-	
	16-3	-	-	-	
	16-4	-	-	-	
	16-5	-	-	-	
	16-6	-	-	-	
	16-7	-	-	-	
	16-8	-	-	-	

は分離されず、*stx1* 陽性株は全て *eae* を保有しているという特徴が認められた (図 1)。特定の遺伝子がいずれも検出されなかった株については、市販の核酸抽出キットを用いて精製した DNA をテンプレートした PCR も実施したが、結果に差異は認められなかった。*Stx* はその種類によってヒトに対する毒性が異なることが多くの研究により示されており、*Stx2* が *Stx1* の 100 倍程度高い毒性を持つとする報告もある^{6), 7)}。また、*eae* がコードするインチミンは、菌がヒトの腸上皮細胞に接着する際に機能する病原因子である。*stx* に加えてこの *eae* を保有することが EHEC の病原性に重要であるとする報告もあるが⁸⁾、その一方で、*eae* を保有しない株であっても出血性大腸炎が発症した例が報告されており⁹⁾、単純にこれら病原性関連遺伝子の種類や有無のみで、その病原性を判断することは難しい。また、*Stx1* および *Stx2* については、それぞれアミノ酸配列の異なる多くのバリエーションが存在することが知られている¹⁰⁾。今回分離された EHEC 株が持つ *Stx1*, *Stx2* についても、そのサブタイプまで同定することで、より詳細な分類や病原性の推測が可能となる可能性は高い。

次に、各株の血清型の同定を行った。ヒトでの重症患者由来 EHEC の主要な O 血清型である O26, O103, O111, O121, O145, O157, O165 を判定するためのマルチプレックス PCR 法が構築されており^{11), 12)}、この手法を応用した検討を行った。結果、12 株が O26 と判別されたが、O157 を含め、検証したその他の血清型はいずれも認められなかった (表 2)。また、O26 と判別された株の全てが黒毛和種から分離され、*stx1* および *eae* 陽性であった。今回、EHEC の分離に使用したクロモアガー STEC 培地では、血清型によって特徴的な藤色のコロニー形成頻度が異なることが製品マニュアルにも記載されており、他の主要でない EHEC 血清型が、選択培養の時点で除外されていた可能性は否定できない。しかしながら、我が国においてはヒト患者由来、牛糞便由来、いずれの場合においても O157 の分離比率が最も高いことが知られており^{1), 4)}、この点において、本研究結果は既存の報告とは異なるものであった。一方、牛の種別で見た場合、O26 の乳用牛からの分離率が相対的に低いことは過去の研究において既に報告されている¹³⁾。飼育環境を含め様々な要因が考えられるが、濃厚飼料の多給が牛腸管内における O157 の増加および継続的な排菌に関与することを実験的に示した報告例があり¹⁴⁾、本研究における O26 の黒毛和牛に限局した分離状況も、こうした飼料の違いに起因した結果である可能性は高い。O26 を原因とする集団感染事例は毎年国内で発生しており、その感染源は多くの場合特定されていない¹⁵⁾。また、O157 と比較した場合、O26 感染事例では発症率が低く、無症状病原体保有者が多いという特徴が認められる¹⁾。しかし、O26 も O157 と同程度の感染力を持つと考えられており、EHEC 感染事例全体における O157 が占める割合は以前と比較して低下しているのに対して、O26 による事例数は相対的な増加傾向が認められる¹⁾。その直接的な要因は不明であるが、食品への汚染源の一つと考えられる牛糞便中における O26 についても、今後は疫学的な調査を重ね注視していく必要があると考える。

図 1 各遺伝子の保有株数。



今回、*stx1*, *stx2*, *eae* の保有パターンが異なる株が同一サンプル中から同時に分離される場合が複数認められた (サンプル 1, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 14). 同様に、O26 株の分離数もサンプルによって 1 株から 8 株と差が認められた. そこで、同一サンプルから分離された株間の相同性を確認する目的で RAPD 解析を試みた. O26 株が分離されたサンプルを中心に複数のサンプルを選択し、そこから分離された 8 株間での比較解析を行ったところ、*stx1*, *stx2*, *eae* の保有パターンが同一の株であっても、RAPD 法では異なるバンドパターンを示す場合が複数存在し、遺伝学的に異なる複数の株が混在している可能性が示唆された (図 2). EHEC の相同性を解析する手法としては、従来パルスフィールドゲル電気泳動法が広く用いられていたが、IS-printing 法や Multiple-local variable-number tandem repeat analysis 法の使用も拡大している. RAPD 法は、任意に設計した特異性の低い短いプライマーを用いて PCR を行い、得られたバンドパターンにより菌株を識別する方法である¹⁶⁾. 対象とする生物のゲノム情報を全く必要とせず、基本的には全ての生物に適用できるという利点があり、コストや操作の簡便さの面でも優れている一方で、その再現性や確実性は乏しいという欠点が存在する¹⁷⁾. EHEC の性状解析においても、RAPD 法単独では詳細な相同性の確認や大まかな血清型の分類等を行うことは不可能であるが、今回の解析のように、同一サンプル中から複数の株が分離された場合の 1 次選別やスクリーニング試験として応用できる可能性が考えられる.

本研究で得られた結果については、サンプル数や採材場所が限局的であるため、これだけを以て大局的な議論を行うことはできない. 国内外で行われている同様の疫学調査の結果も踏まえた上で、今後も経時的な調査を行い、結果の傾向や再現性を注意深く検討しデータを積み重ねていく必要がある.

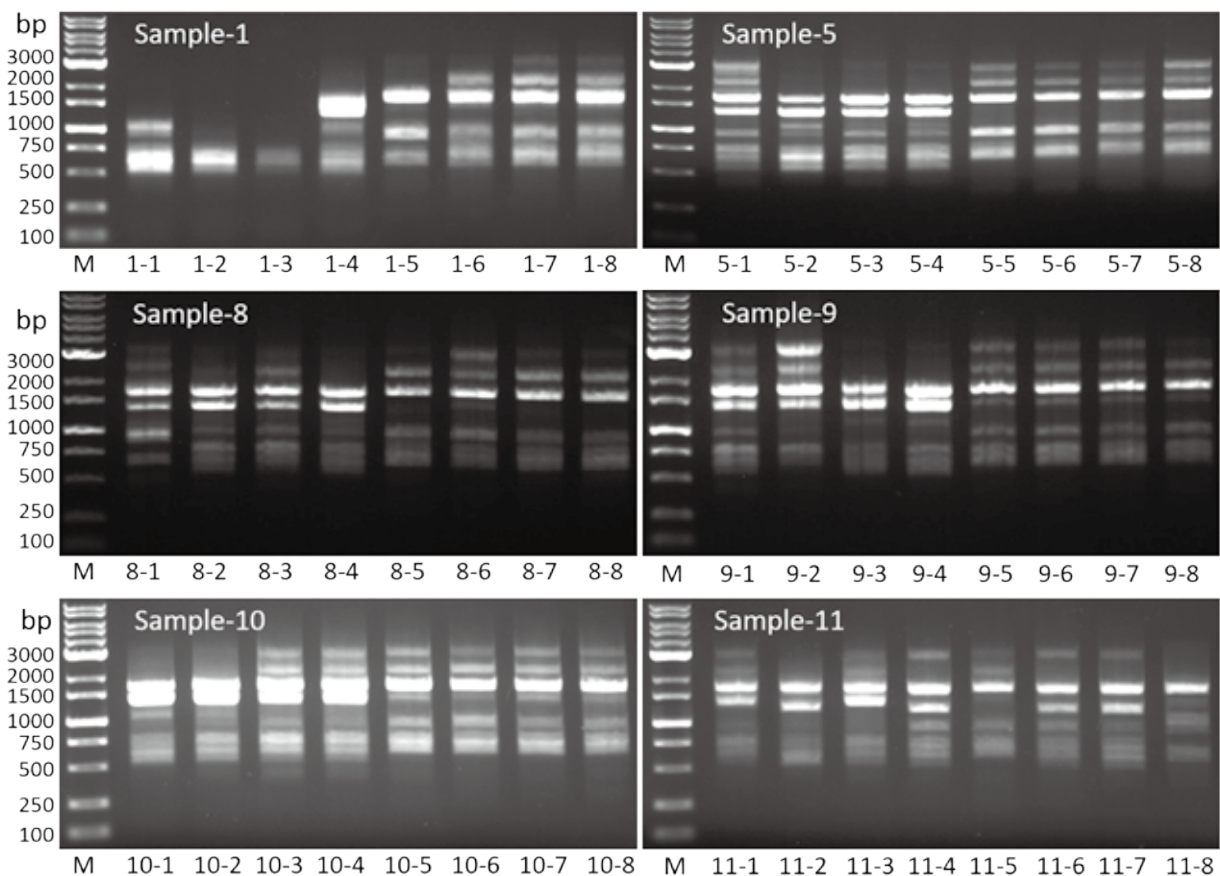


図 2 RAPD 法による分離株の相同性の検討. Sample1, 5, 8, 9, 10, 11 から分離された 8 株の RAPD 解析の結果を示す. M は分子量マーカー.

参考文献

- 1) 国立感染症研究所 : IASR, Vol. 43, No.5, 2022.
- 2) 国立感染症研究所 : IASR, Vol. 33, No.7, 194-196, 2012.
- 3) Sakai Y, Tsujiyama Y, Kusukawa M, Murakami M, Katayama S, and Yamada Y : Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. *Vet Micro.* 150: 140-145. 2011.
- 4) Ezawa A, Gocho F, Saitoh M, Tamura T, Kawata K, Takahashi T, and Kikuchi N : A three-year study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 on a farm in Japan. *J Vet Med Sci.* 66: 779-784. 2004.
- 5) Matsumoto S, Watanabe K, Imamura A, Tachibana M, Shimizu T, and Watarai M : Comparative Analysis Between *Paramecium* Strains with Different Syngens Using the RAPD Method. *Microbial Ecology.* 84: 594-602. 2022.
- 6) Gyles CL : Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 85:E45-E52. 2007.
- 7) Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM : Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157 : H7 infections. *J Infect Dis.* 160: 994-998. 1989.
- 8) Nataro JP and Kaper JB : Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201. 1998.
- 9) Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaufuss S, and Gleier K : Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 42: 1099-1108. 2004.
- 10) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, and O'Brien AD : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 50: 2951-2963. 2012.
- 11) 井口純, 秋吉充子, 伊豫田淳, 大西真 : 腸管出血性大腸菌の主要な O 血清群と病原性遺伝子を判定する One-shot マルチプレックス PCR 法の開発と評価. *日本食品微生物学会雑誌.* 32: 215-218. 2015.
- 12) Paddock Z, Shi X, Bai J, and Nagaraja TG : Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol.* 156: 381-388. 2012.
- 13) Sakai Y, Murakami M, Maruyama N, Yamamoto K, Haruna M, Ito K, and Yamada Y : Comparison of the Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains O157 and O26 between Beef and Dairy Cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* 75(9): 1219-1221. 2013.
- 14) 中澤宗生, 鮫島俊哉 : 牛の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の排菌と飼料の関連. *感染症学雑誌.* 76: 76-77. 2002.
- 15) 国立感染症研究所 : IASR, Vol. 37, No.5, 92-93, 2016.
- 16) Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535. 1990.
- 17) Riley LW : *Molecular epidemiology of infectious diseases principles and practices.* ASM Press. 2004.
- 18) Cebula TA, Payne WL, and Feng P : Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga like toxin type by mismatch amplification mutation assay multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 33: 248-250. 1995.
- 19) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, and Caprioli A : Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* : characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* 68: 64-71. 2000.
- 20) Bertrand R and Roig B : Evaluation of enrichment free PCR based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157 application to municipal wastewater. *Water Res.* 41: 1280-1286. 2007.
- 21) Stoek T and Schmidt HJ : Fast and accurate identification of European species of the *Paramecium aurelia* complex by RAPD-fingerprints. *Microbial ecology.* 35: 311-317. 1998.
- 22) Skotarczak B, Przyboś, Wodecka B, and Maciejewska A : Random amplified polymorphic DNA fingerprinting as a marker for *Paramecium jenningsi* strains. *Folia biologica.* 52: 117-124. 2004.

原 著

大規模肉用牛農場で発生した牛呼吸器病症候群とその対策

大山ゆき¹⁾, 亀山光博²⁾

[2022年12月7日受付・2023年3月9日受理]

ORIGINAL ARTICLE

Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) on Large Cattle Farms and Countermeasures

Yuki Ohyama¹⁾, Mitsuhiro Kameyama²⁾

1) Yamaguchi Prefectural Chubu Livestock Hygiene Center

2) Yamaguchi Environmental Health Center

要 約

牛呼吸器病症候群 (BRDC) は病原体、環境及び生体の要因が複雑に影響し合って発生する経済的損失の大きい重要疾病である。2018年以降、当所管内の約500頭を飼養する肉用牛農場においてBRDCによる死廃事故が多発し、その発生予防の取組について2019年度から総合的な対策を講じてきた。

2020年度は、2019年度の取組に加え、踏込消毒槽の消毒液交換の徹底及び肥育素牛導入前後の煙霧消毒を実施した。さらに健康観察のためのサーモグラフィーの導入や、異常の有無や診療状況の記録簿の作成、従業員間の情報共有を行い、異常牛の早期発見に努めた。また、2019年度のワクチンプログラムの検証結果に基づき、より効果的なプログラムを作成し検討した。取組の結果、農場従業員に広く飼養衛生管理の意識が浸透し、農場の衛生対策の改善が図られ、新たなワクチンプログラムによる細菌・ウイルスに対する免疫獲得の向上が確認された。また、2018年度に比べ、呼吸器病に係る初診頭数及び診療費が大幅に減少した。

キーワード：BRDC, ワクチンプログラム, 抗体検査, 飼養衛生管理

ABSTRACT

Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) is a serious disease caused by the complex interaction of pathogens and environmental and biological factors, and causes great economic loss. Since 2018, there have been many cows slaughtered owing to BRDC a beef cattle farm, which raise approximately 500 cattle within our jurisdiction. Comprehensive measures have been taken since 2019 to prevent such occurrences. In 2020, in addition to the efforts taken in 2019, frequent exchange of the disinfectant solution in the step-in disinfection tank and fume disinfection before and after the introduction of cows has been performed. We also introduced thermography for health observation, created a record book for the presence or absence of abnormalities and medical care, and shared information at professional meetings to detect BRDC-affected cattle at an early stage. Additionally, on the basis of verification results of the 2019 vaccination program, we created and examined a more effective program. As a result of these efforts, compared with 2018, we confirmed that farm employees were more aware

1) 山口県中部家畜保健衛生所

2) 山口県環境保健センター

連絡責任者：大山ゆき 山口市嘉川671-5

〒754-0897 山口市嘉川671-5 TEL：083-989-2517 FAX：083-989-2518

E-mail：ohyama.yuki@pref.yamaguchi.lg.jp

of the need to improve hygiene management, including improved farm hygiene measures and improved immunity to bacteria and viruses through the new vaccination program. Furthermore, compared with 2018, the number of first visits and medical expenses related to respiratory diseases decreased significantly in 2020.

Key words: BRDC, Vaccination program, Antibody test, Rearing Hygiene Management

1 はじめに

牛呼吸器病症候群 (BRDC) とは、病原体、環境及び生体の要因が複雑に影響し合って発生する経済的損失の大きい重要疾病である¹⁾。BRDCは発熱、発咳、鼻汁が初期症状であり、その後、症状の悪化により食欲減退、呼吸促迫、沈うつ等を呈し、呼吸困難に至る。死亡率が高く、回復しても発育不良になることが多い疾病である¹⁾。

今回、BRDCが多発する一農場において、2019年度以降被害低減に向け総合的な対策を講じたので、その成果について報告する。

2 農場概要

当該農場は肉用牛一貫経営農場であり、農場主及び従業員5名が約500頭を飼育していた。肥育素牛の大部分は乳用種(去勢)、交雑種であり、10～60日齢の牛を毎月10～20頭程度県外市場から導入していた。導入後は、約2か月齢まで哺育舎で飼育し、2か月齢から子牛舎Aで、3か月齢から子牛舎Bで群飼した後は6か月齢から21か月齢まで肥育舎で肥育し出荷していた。

3 経緯

当該農場は、これまで年間を通して哺育舎、子牛舎A、子牛舎Bで呼吸器病が頻発しており、特に2018年度は例年に比べBRDCによる死産が多発した。BRDCが農場に対し多大な被害を与えていたため、2019年4月から家畜保健衛生所、農場、診療獣医師及び製薬会社が連携して定期的に検討会を開催し、様々な面から対策を実施した²⁾。

2020年度には前年度の取組を継続しながら新たな取組も行った。

4 取組と結果

(1) 農場における取組

これまで農場では、煙霧機(pulsFOG K-10: SP型, pulsFOG社, Germany)による煙霧消毒を月1回実施していた。消毒薬にはヨウ素系殺菌消毒剤を2,000倍希釈したものを使用した。2019年度は煙霧消毒の頻度を月1回から週2回に増加し、煙霧消毒の効果を増強させるため、畜舎入口に扉を設置するなど、実施時の密閉性を向上させた。さらに、2020年度は導入前後、及び移動時にも実施した。また、2019年度、各牛舎入口に洗浄用と消毒用の踏込槽をそれぞれ設置した。2020年度は洗浄用踏込槽に人工芝を敷き、より靴底の汚れが落ち易くなるよう工夫し、さらに消毒液を毎日交換するよう徹底した(図1)。

2020年度の新しい取組として、毎日の健康観察における牛群の検温にサーモグラフィー(FLIRC2, 新栄電子計測器, 神奈川県)を導入した(図2)。これまでは電子体温計による個別の体温測



図1 人工芝を設置した踏み込み消毒槽



図2 サーモグラフィーを用いた健康観察



図3 ミーティングによる情報共有

定であったため、サーモグラフィーにより牛群の中から発熱を呈している牛を瞬時に発見し対応できるよう作業の効率化を図ることができた。また、飼養牛ごとの記録簿を作成することで誰でもすぐに異常の有無や診療状況等を確認できるようにした。さらに、ミーティング時に従業員間で情報共有を図り、異常牛の早期発見に努めた(図3)。

(2) 新たなワクチンプログラムの検討

2019年度のワクチンプログラムの検証結果に基づき、ワクチンプログラムを変更した(図4)。従来は導入時に2価のウイルス性呼吸器病生ワクチン、2週間後に *Mannheimia haemolytica*(Mh) 不活化単味ワクチン、4週間後に6価のウイルス性呼吸器病生ワクチンを接種していた。

2019年度の検証で、子牛かMhの他に *Pasteurella multocida* (Pm) が検出されたため、Mh単味不活化ワクチンから3価の混合ワクチン〔Mh, Pm, *Histophilus somni*(Hs)〕に変更した。加えて、2019年度の検証で1回の接種では免疫応答が十分ではなかったため、導入時と4週間後の

2回接種に変更した。また、従前はウイルス性呼吸器病に対し、導入時に鼻腔内投与型の牛伝染性鼻気管炎(IBR)・牛パラインフルエンザ(PI3)混合生ワクチン、4週間後にIBR・牛ウイルス性下痢2価(BVD1, BVD2)・PI3・牛RSウイルス(RS)・牛アデノウイルス7型(AD7)混合生ワクチンを接種していたが、6価の混合生ワクチンに関しては導入2週間後に接種することで、導入子牛が早期に免疫の獲得が期待できるように変更した。

ワクチンプログラムを変更したことによる抗体の推移を確認するため、2020年2月に導入した牛10頭について2~7月に毎月採血し、抗体価を測定した。抗体価測定は、株式会社微生物学研究所に依頼し、IBR, BVD1, BVD2, RSについては中和試験、PI3, AD7, HsについてはHI試験、Mh, Phについてはエライザで実施した。中和抗体価、HI価ともに2倍以上を免疫応答ありとした。検討の結果、子牛①のようにワクチン接種による抗体価の上昇が概ね認められた個体(図5)と、子牛④のように、導入時から抗体価が高く、



図4 ワクチンプログラムの変更点

すべてのワクチン株に対して抗体価の上昇がみられない個体(図6)が認められた。ワクチンによる免疫応答に個体差がみられる原因として、導入時期が子牛①は生後36日齢、子牛④は14日齢とばらつきがあり、移行抗体の影響により個体差が認められたと推察された。

導入牛10頭の結果から、BVD1、BVD2、PI3、

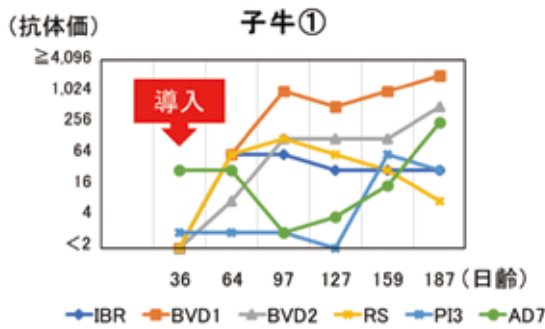


図5 抗体検査結果
(ウイルス・免疫応答あり)

表1 抗体検査結果
(ウイルス・導入牛10頭)

個体番号	導入日齢	導入元	免疫応答					
			IBR	BVD1	BVD2	RS	PI3	AD7
①	36	A県	○	○	○	○	○	○
②	34	A県	○	○	○	○	○	○
③	16	B県	○	○	○	×	○	△
④	14	B県	×	×	×	×	△	○
⑤	18	B県	×	○	○	○	○	○
⑥	21	C県	×	○	○	×	○	○
⑦	37	C県	×	×	○	×	○	○
⑧	25	C県	×	○	○	×	○	○
⑨	57	C県	×	○	○	×	○	○
⑩	25	D県	×	○	○	○	○	○

○:免疫応答あり、×:なし、△:判定不能

5 成果

本事例では2019年度の取組に加え、さらなる飼養衛生管理の改善、農場独自の取組、新ワクチンプログラムの検討を実施した。その結果、呼吸器病に係る初診頭数は2018年度163頭、2019年度83頭、2020年度12月末時点37頭と大幅に減少した(図7)。対策を開始した2019年度以降の初診頭数は月5~10頭ほどで推移し、2020年6

AD7については8~9割の個体で免疫応答が認められたが、IBR、RSについては3~4割程度であった(表1)。

呼吸器病関連細菌に関する検査もウイルスと同様に行った結果、Hsについては5割であったが、Mh、Pmについては8~9割の個体で免疫応答が認められた(表2)。

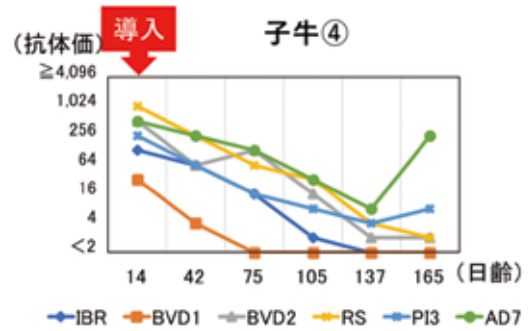


図6 抗体検査結果
(ウイルス・免疫応答なし)

表2 抗体検査結果
(細菌・導入牛10頭)

個体番号	導入日齢	導入元	免疫応答		
			Hs	Mh	Pm
①	36	A県	○	○	○
②	34	A県	○	○	○
③	16	B県	△	○	○
④	14	B県	○	○	○
⑤	18	B県	○	○	○
⑥	21	C県	△	△	○
⑦	37	C県	△	×	△
⑧	25	C県	△	○	○
⑨	57	C県	△	○	○
⑩	25	D県	○	○	○

○:免疫応答あり、×:なし、△:判定不能

月のように0頭となる月もあった。

また、初診頭数が減少したことに伴い呼吸器病に係る年間診療費も2018年度に対して大幅に減少した(図8)。対策後、ワクチンや消毒薬に関する経費が増加したものの、全体としては費用が減少した。診療頭数が減ったことで、費用の面だけでなく、診療に関わる従業員の労力も節減された。

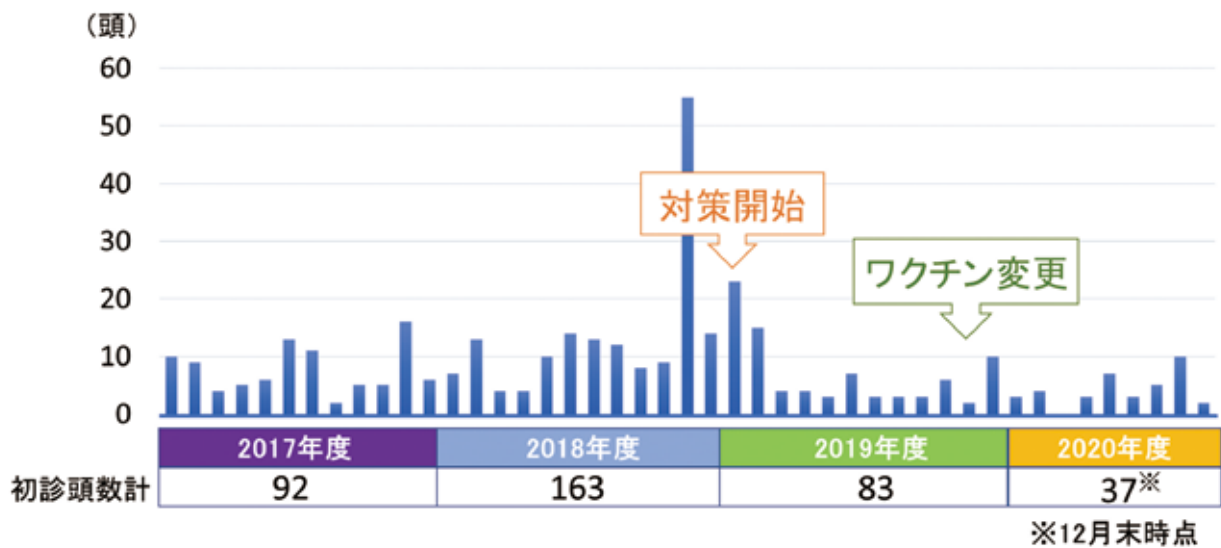


図7 呼吸器病に係る初診頭数の推移

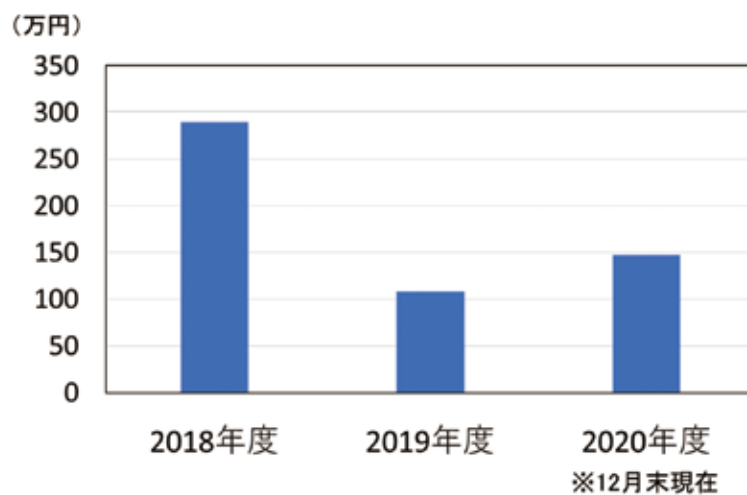


図8 呼吸器病に係る診療費

6 考察

2020年度の取組により、従業員に広く飼養衛生管理の意識が浸透・向上し、衛生対策の改善が図られた。また、新たなワクチンプログラムによる免疫獲得の向上が確認された、これらの取組によりBRDCの発生頭数が減少し、それに伴い診療費も減少した。

しかし、新たなワクチンプログラムでも十分な免疫が獲得できない個体も確認された。その原因として、導入月齢が0～2か月とばらつきがあり、子牛へのワクチンによる能動免疫の誘導に移行抗体が干渉したと考えられた³⁾。対策として、導入する子牛の導入元を限定することや、新たなワクチンプログラムの効果が十分に発揮できるよう、導入月齢を統一することが挙げられる。しかし、一度の市場で10～20頭の子牛を導入することを考慮すると、このような対策は困難と思われ、当該農場では個々の月齢に応じたワクチン接種時期の検討が必要であると考えられた。また、今回のワクチンプログラムはプライムブーストワクチン戦略(Prime Boost Immunization Strategy:PBVS)に基づいたプログラムである。PBVSのなかでも、特に異種PBVSと呼ばれる戦略では、1回目のワクチン接種に対して、2回目以降のワクチン接種に1回目と異なるワクチン、投与経路あるいは免疫付与のメカニズムを用いることで、より免疫系が刺激され、より高い抵抗性が得られるとされている⁴⁾。細菌性呼吸器病に対するワクチンは同じ注射型の不活化ワクチンを2回接種しているため、Hsに関して十分な免疫応答が得られなかった可能性がある。ウイルス性呼

吸器病に対するワクチンは1回目が鼻腔粘膜ワクチン, 2回目が注射型ワクチンのため, 異種PBVSに準じているが, それでもIBR,RSの免疫応答が3~4割程度であった。BRSVに関しては, 投与経路を「鼻腔-注射-注射」とし, ワクチン種類を「生-不活化-不活化」としたところ, 他の接種法と比較してBRSV抗体が高かったことが報告されている⁵⁾。従って, 細菌性呼吸器病に対するワクチンは2回目に不活化ワクチン, ウイルス性呼吸器病に対するワクチンは2回目, 3回目に不活化ワクチンを接種する検討も必要である。

今後もBRDCの発生を抑制するため, 農場や関係者と緊密な連携をとり, 農場の現状に応じた実現可能な対策について指導していきたい。

ワクチンプログラム検証のため, 抗体検査の実施及び御助言をいただいた株式会社微生物学研究所, ささえあ製薬株式会社の諸先生方に深謝いたします。

<引用文献>

- 1) 浅井鉄夫, 臼井優, 海野年弘, 大林哲, 加藤敏英, 金澤明美, 田村豊, 原田和記, 保木秀一: 牛呼吸器症候群 (BRDC) における抗菌剤治療ガイドブック. 農林水産省, 1:2-3.2015
- 2) 鶴田祐哉, 伊藤博志: 大規模肉用牛農場で発生した牛呼吸器病症候群 (BRDC) とその対策. 山口県獣医師会雑誌, 第46号, 17-22.2020
- 3) 家畜感染症学会: 新しい子牛の科学. 緑書房, 1:194-195.2021
- 4) Woodland DL: Trends Immunol, 25(2), 98-104.2004
- 5) Erickson NEN, Berenik A, Lardner H, et al.: Can Vet J, 62(1), 37-44.2021

症 例

胆嚢粘液嚢腫を疑った粘液産生性胆管癌の猫の1例

原口友也¹⁾*, 下ノ原 望²⁾, 大草朋子^{1,3)}, 伊藤嵩人¹⁾, 辻 可奈子¹⁾,
板本朗代¹⁾, 脇本美保¹⁾, 山下祐里¹⁾, 壹岐 茜¹⁾, 沖汐 恵¹⁾, 新田直正¹⁾

[2022年11月7日受付・2022年12月16日受理]

CLINICAL CASE

Mucinous biliary carcinoma in a cat suspected with gallbladder mucocele.

Tomoya HARAGUCHI¹⁾*, Nozomi SHIMONOHARA²⁾, Tomoko OKUSA^{1,3)},
Takato ITO¹⁾, Kanako TSUJI¹⁾, Tokiyo ITAMOTO¹⁾, Miho WAKIMOTO¹⁾,
Yuri YAMASHITA¹⁾, Akane IKI¹⁾, Megumi OKISHIO¹⁾ and Naomasa NITTA¹⁾

Fammy Animal Medical Center¹⁾, IDEXX Laboratories, Inc.²⁾,

The United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University³⁾

要 約

14歳10カ月齢、避妊済み雌の雑種猫が食欲廃絶を主訴に来院した。症例は黄疸が認められ、血液生化学検査と腹部超音波検査で胆嚢粘液嚢腫（GBM）および肝外胆管閉塞（EHBO）が疑われた。内科療法に対する反応が乏しいため開腹手術を実施したところ、胆嚢内に粘弾性物質の貯留が認められた。EHBOの解除が困難であったため、胆嚢壁の生検と胆嚢-十二指腸吻合術を実施した。胆嚢壁は胆管癌と診断された。症例に改善は認められず術後6日目に死亡し剖検を行った。剖検では総胆管に発生した胆管癌が肝臓・周辺組織に浸潤しており、腺細胞から粘液分泌が確認された。猫の粘液産生性胆管癌は塊状病変を形成せず、生前診断が困難なケースがある。猫でGBM様の病変が見られた際には稀なケースではあるが粘液産生性の胆管癌を鑑別診断に加える必要があると考えられた。

キーワード：猫、胆嚢粘液嚢腫（GBM）、粘液産生性胆管癌

ABSTRACT

A 14 year-10-month-old intact female domestic shorthair cat with anorexia was presented to our hospital. We suspected gallbladder mucocele (GBM) and extrahepatic bile obstruction (EHBO) on the basis of abdominal ultrasonography and blood examination findings. Medical therapy for GBM and EHBO did not improve the symptoms. An exploratory laparotomy showed a dilated and slightly white, discolored gallbladder and a markedly dilated extrahepatic bile duct. Total cholecystectomy was planned as surgical treatment for the GBM; however, because of severe adhesion between the gallbladder and liver, the gallbladder was first incised and the contents removed. The EHBO remained unresolved despite bile duct irrigation.

- 1) ファミー動物医療センター
- 2) アイデックスラボラトリーズ株式会社
- 3) 山口大学大学院連合獣医学研究科

連絡責任者：原口友也 ファミー動物医療センター

〒747-0053 防府市開出本町12番9号 Tel:0835-22-4711 Fax:0835-22-5494

E-mail:tomoya.haraguchi@gmail.com

Therefore, biopsy of the gallbladder wall and cholecystoduodenostomy were performed to create a bile outflow route. Postoperative recovery was poor, and the cat died 6 days after the surgery. Necropsy was performed, and histopathological examination resulted in a diagnosis of bile duct carcinoma. The tumor was mucilaginous. Feline mucinous biliary carcinoma might be difficult to diagnose. When GBM is suspected in cats, mucinous biliary carcinoma must be considered.

Key words: Cat, Gallbladder mucocele (GBM), Mucinous biliary carcinoma

はじめに

猫の胆管癌は、悪性肝胆道系腫瘍の22-41%を占める。本腫瘍は、塊状、結節性、びまん性など様々な形態を呈するため、時に診断に苦慮する事がある。胆管に発生した胆管癌は、原発性の肝外胆管閉塞 (Extrahepatic bile obstruction; EHBO) を引き起こすことが良く知られている^{5,6)}。EHBOは続発性に発生することも多く、一般的な基礎疾患として胆嚢粘液嚢腫 (Gallbladder mucocele; GBM) が挙げられる。GBMは犬において遭遇頻度の高い疾患であるが、猫のGBMは稀な疾患であり症例報告が数例ある程度である。^{1,4,9)}

今回、我々は食欲廃絶を主訴に来院した老齢猫において黄疸を認め、血液生化学検査および腹部超音波検査でGBMおよびEHBOを疑った症例において、胆管癌と診断された症例と遭遇し、診断の過程でいくつかの知見を得たため、その概要を報告する。

症例

14歳10カ月齢、避妊済み雌の雑種猫が1週間前からの食欲廃絶を主訴に来院した。初診時の身体検査において、鼻閉および重度の削瘦 (BCS: 2/5) と可視粘膜の黄染が認められた。血液検査では、CBCの異常は認められなかったが血液生化学検査において肝酵素および血漿ビリルビン値の顕著な増加、総蛋白質濃度の増加が認められた (表1)。腹部単純X線検査では、上腹部に

X線不透過性亢進と消化管内にガス貯留所見が認められた。腹部超音波検査では、胆嚢内にエコー輝度が高く可動性のない無血流の胆嚢内容物を認め、胆嚢管と肝内胆管の拡張が認められた (図1 A-C)。腹腔内に明らかな腫瘍病変は確認できなかった。

これらの検査所見より、本症例はGBMおよびEHBOであると仮診断した。

表1. 血液生化学検査

BUN	21.6	mg/dL	TP	9.0	g/dL
CRE	1.03	mg/dL	Alb	3.8	g/dL
ALT	944	U/L	NH3	34	μ g/dL
ALP	964	U/L	V-Lip	13	U/L
T-Chol	302	mg/dL	Na	144	mEq/L
Glu	123	mg/dL	K	3.5	mEq/L
T-Bil	13.1	mg/dL	Cl	99	mEq/L

生化学検査において、肝酵素および血漿ビリルビン値の顕著な上昇と総蛋白質の増加を認めた (太字)。CBCにおいては異常値は認められなかった。

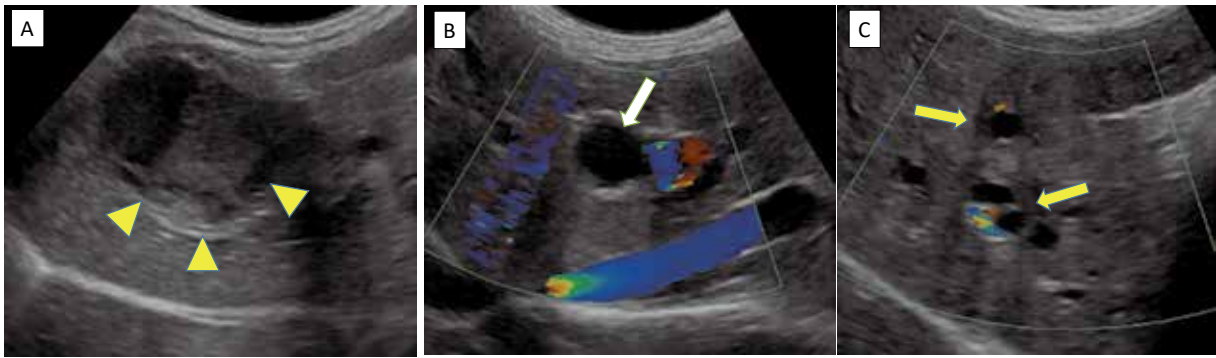


図1. 腹部超音波検査

胆嚢内に可動性のない無血流の内容物(A)を認め、胆嚢管(B)と肝内胆管(C)の拡張が認められた。

治療と経過

初期治療として症例の安定化を目的とし、抗生剤投与 (ABPC 30mg/kg 1日2回, 静脈内投与, ピクシリン注射用 1g, Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京; エンロフロキサシン 5mg/kg 1日1回, 皮下投与, 犬猫用バイトリル 2.5% 注射液; エランコジャパン株式会社, 東京.) と酢酸リンゲル液 (ソルアセト F 輸液, テルモ株式会社, 東京) を用いた輸液療法を行った. 併せて胆嚢周囲の消炎目的でプレドニゾロン 0.5mg/kg 筋肉内投与 (プレドニゾロン注射液 NZ, 日本全薬工業株式会社, 福島) を行った. また, 鼻閉に対して既往歴よりネコヘルペスウイルス感染症の再燃が疑われたため, 組み換え型ネコインターフェロン 1U/kg (インターキャット, 東レ株式会社, 東京) を皮下投与した.

しかし, 症例の全身状態は改善せず血漿ビリルビン値の上昇が認められたため内科的な治療による改善は困難であると判断し, 第6病日に胆嚢摘出術と EHBO 解除を目的として腹部正中切開に

よる試験開腹術を実施した.

麻酔前投与薬としてミダゾラム 0.2mg/kg (ミダゾラム注 10mg「サンド」, サンド株式会社, 東京) を静脈内投与したのちに, プロポフォル 10mg/kg (プロポフロ 28, ソエティスジャパン株式会社, 東京) 静脈内投与 (Dose to effect) で導入した. 麻酔はイソフルラン (イソフルラン吸入麻酔液「VTRS」, マイラン EPD 合同会社, 東京) で維持し, 疼痛管理はプレドニゾロン 0.5mg/kg 筋肉内注射, レミフェタニル塩酸塩 1-5 μ g/kg/min (アルチバ静注用 2mg, ヤンセンファーマ株式会社, 東京) を用いて行なった. 術中点滴には, リンゲル 5 ml/kg/hr (リンゲル液「オーツカ」, 大塚製薬株式会社, 東京) とドパミン塩酸塩 2.5-5 μ g/kg/min (ドパミン塩酸塩点滴静注液 100mg「ファイザー」, マイラン製薬株式会社, 大阪) の持続点滴を用いた.

開腹時には褪色した胆嚢が認められ, 胆嚢には大網が癒着していた. 胆嚢を頭側に反転すると顕著に拡張した肝外胆管が確認された (図2 A-C).

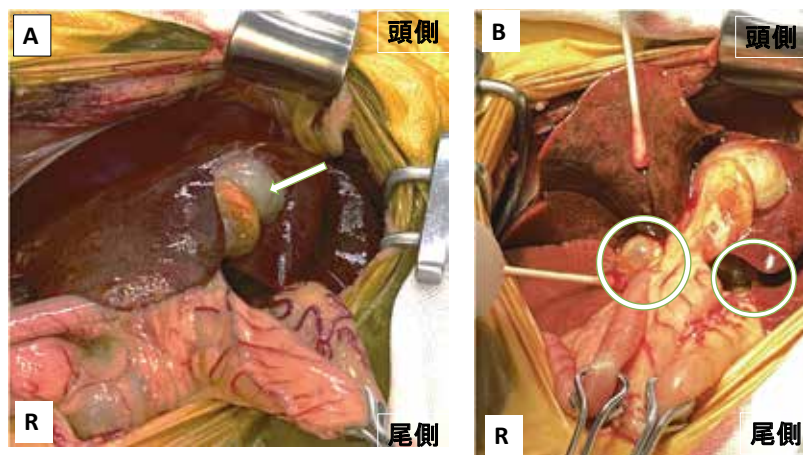


図2. 手術所見-1

開腹するとすぐに, 褪色し大網が癒着した胆嚢が認められた (A; 矢印) 胆嚢を頭側に反転すると顕著に拡張した肝外胆管が確認された (B; 丸印)

スキャンラン鉗子とバイポーラー電気メス、滅菌綿棒を用いて大網を剥離し肝内側右葉と方形葉から胆嚢の剥離を試みた。胆嚢は肝葉と重度に癒着しており胆嚢管までの分離が困難であったため、胆嚢頸部までの分離とした。次いで 11 号メスにて胆嚢切開を行った。胆嚢内容物は、粘性の高いゼリー状の凝塊で充満しており犬の GBM に類似した外観を呈していた (図 3 A)。胆嚢内容物は細菌培養検査に供し、残存内容物はサクシオンにて吸引・除去した。胆嚢切開部より栄養カテーテル (アトム多用途チューブ 8 Fr, アトムメディカル株式会社, 埼玉) にて順行性に総胆管の閉塞解除を試みたが、再疎通は困難であった。総胆管周囲に腫瘍病変は認められなかったが、総胆管は周辺組織と重度に癒着し硬結していた (図 3 B)。そのため、十二指腸切開による逆行性総胆管洗浄は困難であると判断し、胆嚢壁の生検と総胆管周囲硬結部の針生検を行い、胆嚢 - 十二指腸吻合に

よる迂回路形成を実施した (図 3 C)。また、この際に外側右葉と十二指腸からもサンプリングを行い病理組織検査に供した。同時に食道チューブ設置も行い、術後の給餌ルートを確認し手術を終了した。

生検した胆嚢は病理組織検査で胆管癌と診断された (図 4)。また、総胆管周囲の針生検の細胞診でも同様に胆管癌と診断された。外側左葉に腫瘍病変は認められず、胆管肝炎および空胞変性と診断された。十二指腸は軽度から中等度のリンパ球形質細胞性腸炎と診断された。胆汁培養検査の結果は陰性であった。

症例は、術後も全身状態および血液生化学検査所見の改善は認められず、術後 6 日目に斃死した。斃死後、飼い主様の同意を得て剖検を実施した。開腹時の肉眼所見では黄土色の腹水貯留が認められ、胆嚢 - 十二指腸間に重度の癒着が認められた。病理組織検査でも、胆嚢管周囲と拡張した

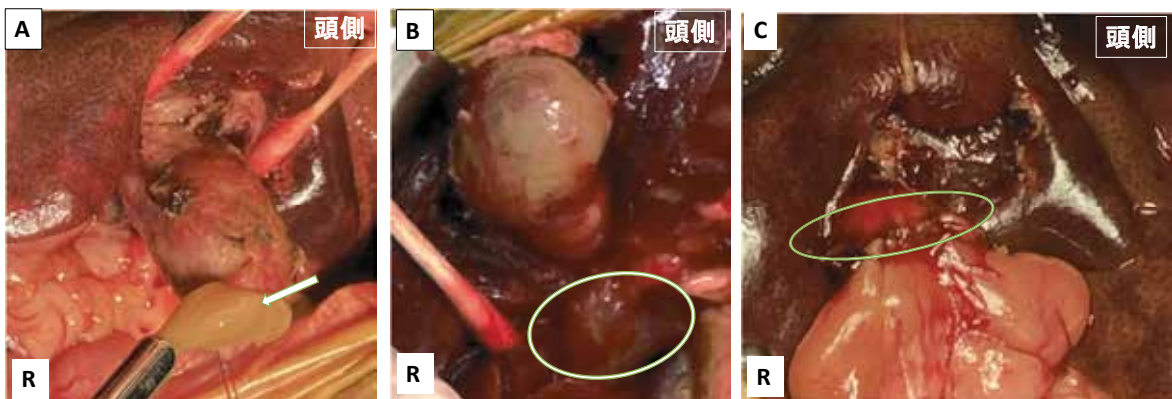


図 3. 手術所見 - 2

胆嚢内容物は粘性の高いゼリー状の凝塊で充満しており犬 GBM に類似した外観を呈していた (A ; 矢印)
総胆管周囲に腫瘍病変は認められなかったが周辺組織と重度に癒着し硬結していた (B ; 丸印)
胆嚢摘出は困難と判断し胆嚢 - 十二指腸吻合術を実施した (C ; 丸印)

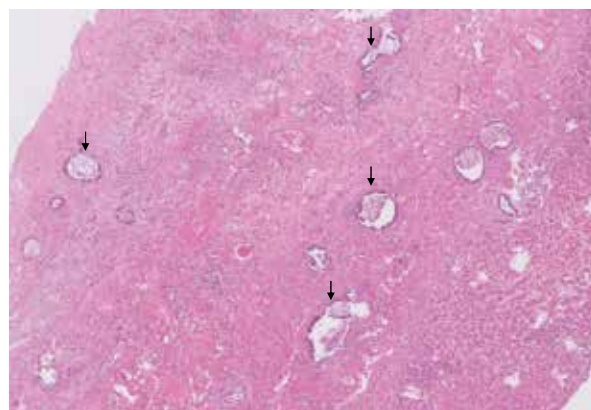


図 4. 病理組織検査 (生検した胆嚢壁)

胆嚢壁に浸潤して粘液産生を伴う (矢印) 上皮系腫瘍細胞を認めた

肝外胆管が含まれる部位の癒着が最も重度であり、拡張した胆管の周囲から隣接する肝臓への腫瘍細胞の浸潤と周辺組織の重度な線維化が認められた (図5 A-B). 肝臓に浸潤した腫瘍は腺管構造を形成しており、その内腔に粘液の貯留が確認された (図6 A). 残存する腫瘍化していない胆

嚢粘膜上皮からは、犬の GBM で認められるような粘液産生は認められなかった (図6 B). これらの所見より、本症例は肝臓・胆嚢への浸潤を伴う総胆管原発の胆管癌により二次的に GBM 様所見を呈した GBM 類似疾患であったと考えられた.



図5. 病理組織検査 (剖検)
胆嚢管周囲と拡張した肝外胆管が含まれる部位が最も癒着が重度であった (A ; 丸印)
拡張した胆管 (*) の周囲から隣接する肝臓への腫瘍細胞の浸潤と周辺組織の重度な線維化 (B)

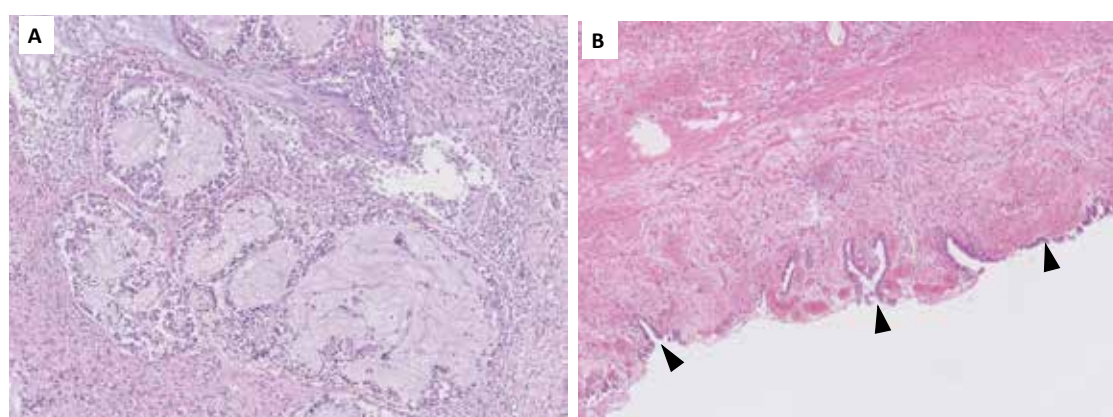


図6. 病理組織検査 (剖検)
肝臓に浸潤した腫瘍は腺管構造を形成し、内腔には粘液が貯留していた (A)
腫瘍化していない残存する胆嚢粘膜上皮 (矢頭) からは、粘液産生は認められなかった (B)

考 察

犬の GBM は、ムチンに富んだ粘性の高い粘液が蓄積することで胆嚢が拡張している状態を指す。本疾患の発生機序の詳細は明らかではないが、病理組織学的には、胆嚢粘膜に嚢胞性粘液性過形成が認められることから、胆嚢壁を形成する粘液産生細胞からの過剰な粘液産生による胆嚢内への粘液貯留と考えられている³⁾。発生の素因としては副腎皮質機能亢進症や甲状腺機能低下症などの内分泌疾患や高脂血症、胆嚢の運動性低下が報告されている³⁾。発生初期には無症状で進行すると胆道系の閉塞、胆嚢穿孔や破裂に伴う胆汁性腹膜炎を引き起こすため、早期の外科的介入が必要な疾患であると考えられている⁷⁾。

いっぽう、猫の GBM に関する報告は3例のみと情報は少ない^{1, 4, 9)}。これらの症例においては、犬とは異なり全症例で EHBO を併発していた。文献では、GBM により産生された粘液が総胆管に詰まり EHBO を発症すると結論付けている。本症例においても、過去の報告と同様に胆嚢内に粘液の貯留を認め EHBO を発症していたが、本症例で認めた GBM 様の所見は胆管癌により EHBO を引き起こし腫瘍細胞から分泌された粘液が胆嚢内に逆流し二次的に形成されたものであったと推測された。このような類似疾患も存在するため、猫の GBM の診断には病理組織検査が必要であると考えられた。

猫における胆管系腫瘍には、胆管細胞腺腫と胆管癌があり高齢猫で発生することが多い^{5,6)}。胆管癌は肝内性と肝外性に分類され、肝内腫瘍と比較し肝外の発生は稀であると言われている。極めて活動的な挙動を示し、転移率は67-80%と報告されており、効果的な治療法はなく予後は極めて悪いとされている^{5,6)}。胆管癌は、塊状、結節性、びまん性の3つのタイプに分かれる。塊状、結節状病変に対しては外科的切除が勧められるが半年以内に死亡することがほとんどである^{5,6)}。本症例における硬結な病変部は、胆汁漏出による二次性の炎症性変化であると考えられたが、病理組織学的診断は胆管癌であった。びまん性の胆管癌は、周辺組織に浸潤し反応性の線維形成を伴うことが多く腫瘤病変として認識されにくいことから、病理組織学的検査の重要性が再確認された。

人では粘液産生胆管腫瘍の報告があり、胆管内の乳頭状増殖と粘液の産生を特徴とし、通常の胆管癌と比較して予後良好な症候群であるという報告がある⁸⁾。著者の調べた限りでは猫においては粘液産生性胆管腫瘍の報告はない。本症例の病理組織検査では、人の粘液産生性胆管腫瘍と類似する所見が認められておらず、臨床的な挙動も大きく異なるため、人の粘液産生性胆管腫瘍と猫の粘液産生性胆管腫瘍は全く異なる疾患であると考えられた。本症例は、食欲廃絶状態が1週間継続した状態で来院しているが、問診によると食欲廃絶に至るまで慢性的な食欲不振が続いていたとのことであった。より早い段階で来院があればEHBOに至る以前に腫瘍細胞が分泌した粘液によりGBM様の腹部超音波検査所見が得られていた可能性が考えられた。また、過去の報告では、猫のGBM全例でEHBOを必発していたため、より早期に腹部超音波検査および血液生化学検査の実施が出来ていれば生前にGBMとの鑑別が行えていた可能性が示唆された。

犬のGBMは腹部超音波検査所見によりステージ分類がなされている²⁾。胆管癌に続発したGBM類似疾患であった本症例は、腹部超音波検査で中等度に進行した犬のGBMと同様の「胆嚢内に等-高エコーの可動性がなく血流のない貯留物」が確認されたため、GBMが疑われた。しかし、過去の報告では猫のGBMは犬のGBM早期の所見と同様に「胆嚢内に低エコーで可動性のない粘液の貯留が認められた」と報告されている。この様に、猫のGBMは犬のGBMとは病態の異なる疾患であることが推測されるため、腹部超音波検査所見での診断には注意が必要であると考えられた。

本研究から、猫の粘液産生性胆管癌は塊状病変を呈さないことがあり生前診断が困難である可能性が示唆された。加えて、GBMを続発させる可能性があり、猫でGBMが疑われた場合には基礎疾患として胆管癌の存在を考慮する必要があると考えられた。

参考文献

1. Bennett S.L., Milne M., Slocombe R.F. and Landon B.P. (2007) : Gallbladder mucocele and concurrent hepatic lipidosis in a cat. *Aust Vet J.*85, pp 397-400.
2. Besso J.G., Wrigley R. H., Gliatto J.M., Webster C. R. (2000) : Ultrasonographic appearance and clinical findings in 14 dogs with gallbladder mucocele. *Vet Radiol Ultrasound* 41. pp261-271.
3. Fossum T.W. (2008): 消化器系の外科. スモールアニマルサージェリー, 第3版 (若尾義人他訳), pp 503-504. インターズ社, 東京.
4. Gaillot H.A., Penninck D.G. and Webster C.R.L. (2007) : Ultrasonographic features of extrahepatic biliary obstruction in 30 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 48. Pp439-447.
5. North S. and Banks T. (2011) : 肝臓胆道系および膵外分泌系の腫瘍. *Small Animal Oncology. 腫瘍性疾患の基礎と臨床*, 丸尾幸嗣他訳, pp166. インターズ社, 東京.
6. Ogilvie G. K. and Moore A.S. (2003): 脾臓, 肝臓, 膵臓の腫瘍. 猫の腫瘍, 桃井康行他訳, pp289. インターズ社, 東京.
7. Smalle, T.M., Cahalane, A.K. and Köster, L.S. (2015) : Gallbladder mucocele: A review. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 86(1):1318.
8. 浦田孝広・真口宏介・高橋邦幸・瀧沼朗生・小山内 学・松崎晋平・深澤光晴・栗田 亮・土屋貴愛・一箭珠貴・桜井康雄・野路武寛・安保義恭・篠原敏也 (2008) : 粘液産生胆管腫瘍の臨床病理学的および診断学的検討. *胆道* 22 卷 1 号, pp71-80.
9. Woods K.S., Brisson B.A., Defarges A.M. and Oblak M.L. (2012) : Congenial duplex gallbladder and biliary mucocele associated with partial hepatic cholestasis and cholelithiasis in a cat.

資 料

子牛の中耳炎に対するデジタルレントゲンを用いた撮影方向の検討

藤原優美¹⁾ 竹山哲矢¹⁾ 國貞宥妃¹⁾ 外川智周¹⁾ 田浦保穂²⁾ 佐々木直樹¹⁾

[2022年4月29日受付・2022年11月2日受理]

Documentation

Investigation of imaging direction using digital radiography for otitis media in calves

Yumi FUJIWARA¹⁾ Tetsuya TAKEYAMA¹⁾ Yuki KUNISADA¹⁾ Tomochika SOTOKAWA¹⁾
Yasuho TAURA²⁾ Naoki SASAKI¹⁾

1) Large Animal Clinical Research Laboratory, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University

2) Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University

(1677-1, Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi, 753-8515)

和文抄録

中耳炎のデジタルレントゲン (DR) 診断を確立するために、山口県内の2農場における9頭の子牛 (中耳炎非罹患牛5頭, 中耳炎罹患牛4頭) を供試し, 鼓室胞を描出できる撮影方向を検討した. その結果, 中耳炎疑いの牛に対して確定診断のためのDRを用いた画像診断が有効であった. また, 20°腹内背外斜位像が最も推奨できるX線照射方向であった.

キーワード: 子牛, 中耳炎, デジタルレントゲン診断

Summary

To establish a digital radiography diagnosis of otitis media, 10 calves (5 without otitis media and 4 with otitis media, from two farms in Yamaguchi Prefecture) were tested to determine the direction of imaging to depict the tympanic vesicle. The results showed that digital radiography was effective for definitive diagnosis in cattle with suspected otitis media. Additionally, the 20-degree ventral-dorsal-external oblique image was the most recommended X-ray exposure direction.

Key words: Calf, Otitis media, Digital X-ray diagnosis

1) 山口大学共同獣医学部大動物臨床学研究室 2) 山口大学共同獣医学部

連絡責任者: 佐々木直樹 山口大学共同獣医学部 大動物臨床学研究室

〒753-8515 山口県山口市吉田1677-1 TEL. 083-933-5940 FAX. 083-933-5940

E-mail: nsasaki@yamaguchi-u.ac.jp

緒 言

中耳炎は、側頭骨内の鼓室の炎症であり、牛、豚および羊では微生物が耳管を経て鼓室に侵入することにより生じることが多い [1, 2]. 牛では *Pasteurella multocida* および *Mycoplasma bovis* が病原菌から分離されている [1, 2]. 中耳炎の主な臨床症状は発熱、耳介下垂、眼瞼腫脹、肺炎症状などであり、重篤化すると神経症状が現れ、慢性に経過すると発育不良や死産の転帰をとる場合がある [2].

中耳炎の診断には、小動物領域においてはCTが使われており、鼓室胞壁が厚くCT値が高いことが中耳炎の特徴である [3]. 大動物領域においても中耳炎診断にCTが有用であるとされる [4, 5] が、大動物領域でのCTの利用は大規模診療施設に限られている。そのため、画像診断により中耳炎を視覚的ならびに客観的に評価するために、デジタルレントゲン (DR) を用いた診断を検討した。

材料及び方法

供試牛は山口県の2農場における子9頭であり、耳介下垂の有無や既往歴から中耳炎非罹患牛 (A~E) 5頭 (ホルスタイン種5頭, 平均日齢94, 雄4頭, 雌1頭) と中耳炎罹患牛 (F~I) 4頭 (黒毛和種1頭, ホルスタイン種3頭, 平均日齢94, 雄4頭) に分類した。非罹患牛, 罹患牛における個体別の基礎情報 (品種, 日齢, 性別), 症状 [体温 (°C), 耳介下垂の有無, 肺音, その他の症状], 撮影方向の一覧は表1, 表2に記載した。

ポータブルレントゲン画像検査装置 (70kV, 2mAs, FUJIFILM Corporation) を用いて下記の4方

向から鼓室胞を描出し, 中耳炎をDRで診断可能か検討した。すなわち, 中耳炎非罹患牛では頭部側方像 (水平方向), 20° 腹内背外斜位像, 45° 腹内背外斜位像, または 45° 背内腹外斜位像とした (図1)。同様に中耳炎罹患牛では, 患耳側にDRカセットを設置し反対側からX線を照射する4方向のいずれかについて検討した。鼓室胞において, 中耳炎非罹患牛では「輪郭明瞭, 内部透過性, 網目状紋様」, 中耳炎罹患牛では「輪郭不明瞭, 内部不透過性亢進, 網目状紋様の消失」の画像が得られることを検討した。なお, 立位保定のため, 周囲の人物や動物は十分に距離を取り安全に撮影を行った。

表1. 中耳炎非罹患牛における個体別の基礎情報 (品種, 日齢, 性別), 症状 [体温 (°C), 耳介下垂の有無, 肺音, その他の症状], 撮影方向一覧

中耳炎非罹患牛	品種	日齢	性別	体温	耳介下垂	肺音	その他の症状	撮影方向
A	ホ	54	♂	41.2	-	両肺粗励	人咳+, 右鼻汁, 右頸リンパ節軽度腫脹, 急性肺炎	45° 腹内背外斜位像, 45° 背内腹外斜位像
B	ホ	97	♂	38.7	-	左前葉捻髪音	右鼻膿汁, 軽度急性肺炎	頭部側方像, 20° 腹内背外斜位像
C	ホ	105	♀	38.7	-	両肺粗励	人咳+, 肺炎	頭部側方像, 20° 腹内背外斜位像
D	ホ	90	♂	39.2	-	正常	泥状下痢便, 眼脂, 眼結膜充血, 気管・気管支炎	20° 腹内背外斜位像
E	ホ	124	♂	40.1	-	正常	慢性肺炎	頭部側方像, 45° 背内腹外斜位像

品種はホルスタインをホ, 黒毛和種を黒と表現した。

表2. 中耳炎罹患牛における個体別の基礎情報 (品種, 日齢, 性別), 症状 (体温 (°C), 耳介下垂の有無, 肺音, その他の症状), 撮影方向一覧

中耳炎罹患牛	品種	日齢	性別	体温	耳介下垂	肺音	その他の症状	撮影方向
F	黒	81	♂	40.4	右	粗励	右耳から漿液漏出, 慢性肺炎	頭部側方像, 20° 腹内背外斜位像, 45° 腹内背外斜位像
G	ホ	97	♂	39.4	左右	正常	下痢, 気管支肺炎, 右飛節炎併発	20° 腹内背外斜位像
H	ホ	104	♂	38.6	-	正常	2か月前に右中耳炎と診断後, 耳道洗浄が行われたが中耳炎継続	20° 腹内背外斜位像, 45° 背内腹外斜位像
I	ホ	94	♂	37.8	右	正常	1か月前に右中耳炎と診断後, 耳道洗浄が行われたが中耳炎継続	45° 腹内背外斜位像, 45° 背内腹外斜位像

品種はホルスタインをホ, 黒毛和種を黒と表現した。

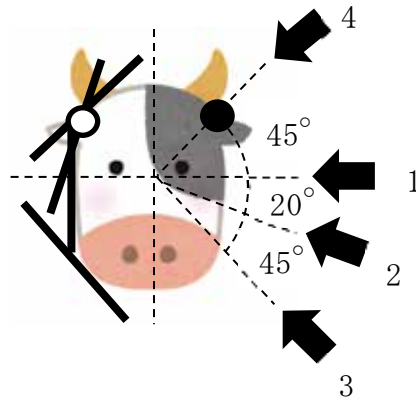


図1. X線照射方向

矢印1：頭部側方像，矢印2：20°腹内背外斜位像，矢印3：45°腹内背外斜位像，矢印4：45°背内腹外斜位像，
 〃：DRカセット，○：右鼓室胞，●：左鼓室胞

結果

頭部側方像は、非罹患牛B, C, Eおよび罹患牛Fで実施した。非罹患牛、罹患牛ともに左右の鼓室胞が重なり、診断に適する画像が得られなかった(図2)。

一方、20°腹内背外斜位像は非罹患牛B, C, Dおよび罹患牛F, G, Hで実施した。非罹患牛Dの左右鼓室胞は輪郭明瞭、内部透過性、網目状紋様が認められた(図3)。同条件の非罹患牛B, Cにおいても同様な結果が得られた。罹患牛Gの

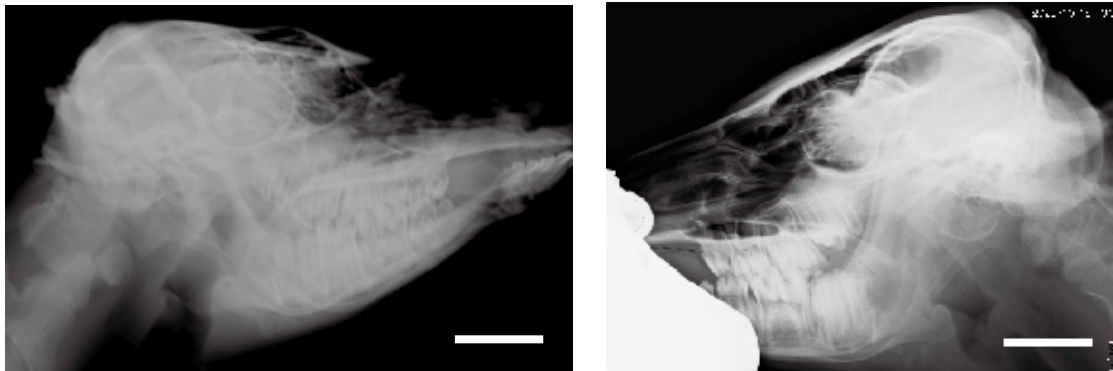


図2. 非罹患牛B 頭部側方像(左), 罹患牛F(右中耳炎) 頭部側方像(右), 〃：10cm

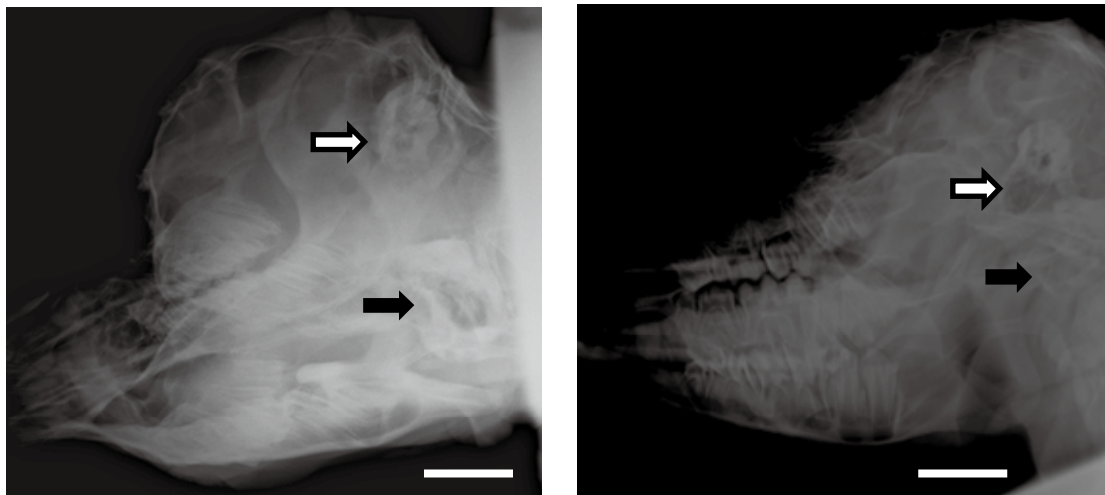


図3. 非罹患牛D 20°腹内背外斜位像(左), 罹患牛G(右中耳炎) 20°腹内背外斜位像(右),
 ⇨：左鼓室胞, ⇨：右鼓室胞, 〃：10cm

左鼓室胞は輪郭明瞭であるのに対し、右鼓室胞は輪郭不明瞭、内部不透過性亢進、網目状紋様の消失が認められ右中耳炎と診断された(図3)。同条件の罹患牛F、H、においても同様な結果が得られた。

さらに、45°腹内背外斜位像是非罹患牛Aおよび罹患牛F、Iで実施した。非罹患牛Aの左鼓室胞の輪郭は明瞭であったが、右鼓室胞の一部が隠れて不明瞭であった(図4)。罹患牛Iの右鼓室胞は輪郭不明瞭、内部不透過性亢進が認められ右

中耳炎と診断された(図4)。同条件の罹患牛Fにおいても同様な結果が得られた。

45°背内腹外斜位像は非罹患牛A、Eおよび罹患牛H、Iで実施した。非罹患牛Aは左右鼓室胞の一部が隠れていた(図5)。同条件の非罹患牛Eにおいても同様な結果が得られた。罹患牛Iの左鼓室胞は明瞭に描出できたが、右鼓室胞の一部が隠れていた(図5)。同条件の罹患牛Hにおいても同様な結果が得られた。

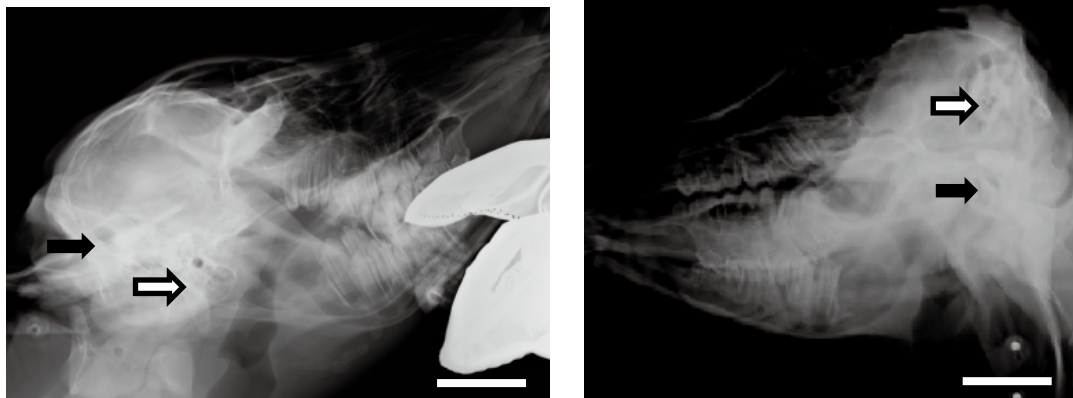


図4. 非罹患牛A 45°腹内背外斜位像(左)、罹患牛I(右中耳炎) 45°腹内背外斜位像(右)、
⇨: 左鼓室胞, ⇨: 右鼓室胞, —: 10cm

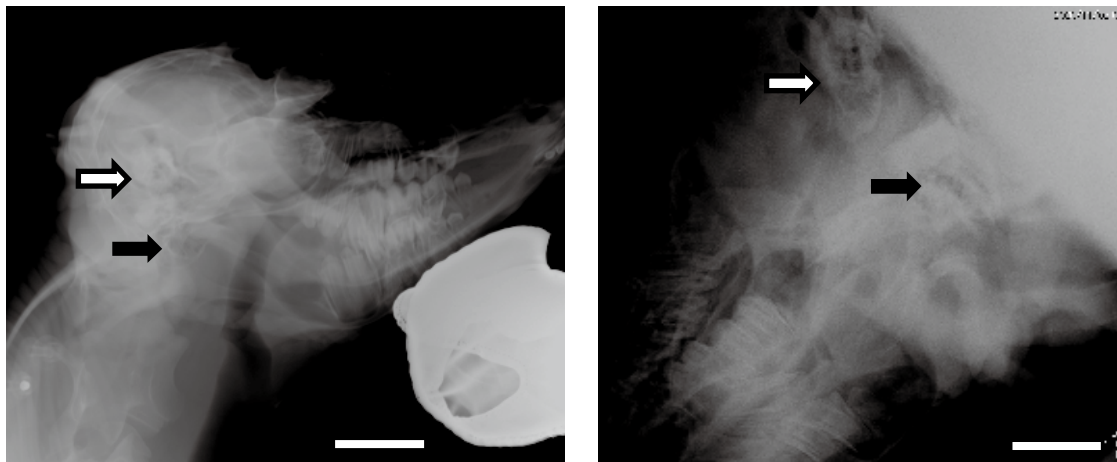


図5. 非罹患牛A 45°背内腹外斜位像(左)、罹患牛I(右中耳炎) 45°背内腹外斜位像(右)、
⇨: 左鼓室胞, ⇨: 右鼓室胞, —: 10cm

考 察

中耳炎が認められた場合の処置として、抗生物質および抗炎症剤投与の内科的治療や、耳道洗浄や鼓室胞切開術等の外科的治療が実施される[2, 6, 7]。外科的治療の場合は鼓膜穿孔が必要となるが、これは侵襲性のある治療となるため、中耳炎と診断できた症例に対し外科的治療を施すことが望ましい。

中耳炎罹患牛では鼓室胞内の液体貯留や鼓室胞壁の肥厚、石灰化により、「輪郭不明瞭、内部不透過性亢進、網目状紋様の消失」の画像が得られる[2, 8]。今回、左右鼓室胞を同時に描出できる角度を検討

するために4方向から撮影を行った。頭部側方像は健康牛、右中耳炎である罹患牛ともに左右鼓室胞が重なり読影不可能であった。そのため、健康牛と罹患牛を判別できず診断に用いることはできないと考えられた。45°腹内背外斜位像においては健康牛の左鼓室胞は輪郭明瞭であったが、右鼓室胞は一部隠れていた。したがって、左右鼓室胞の重なりは回避できる角度であるが、耳介が鼓室胞描出の障壁となる場合があるため診断に適さない角度であると考えられた。45°背内腹外斜位像においては健康牛の左右鼓室胞の一部が隠れていた。さらに罹患牛の左鼓室胞は明瞭に描出可能であったが、右鼓室胞の一部が隠れていた。このように健康牛、罹患牛ともに鼓室胞の一部が隠れてしまうことで鼓室胞が不明瞭となっていたことは鼓室胞とDRカセットの位置が離れていたことが原因と考えられる。これらの3方向では鼓室胞の明瞭な描出が困難であったが、20°腹内背外斜位像では左右鼓室胞が重なることがなく、他の障壁もないことから明瞭に描出可能な角度であった。

小動物領域で一般的に中耳炎診断に用いられるCT撮影には、牛を寝かせるために鎮静剤を必要とする。また、キシラジン鎮静によって保定横臥位または自然横臥位をとりDRにて画像撮影を行った報告もある[6]。しかし、今回の方法では立位保定のみで行うことが可能であった。立位保定が困難な症例には前者を、肺炎の併発などでキシラジンの使用を避けたい症例や立位保定が可能な症例には後者である今回の方法を採用するのが望ましいと考えられた。

以上のことから中耳炎疑いの牛に対して確定診断のためには、20°腹内背外斜位像が最も有効であった。今後、除角済みの成牛等、子牛以外においても中耳炎のDR診断に応用可能と考えられた。

引用文献

- 1) 森田剛仁：動物病理学各論，2版：382，文英堂出版，東京． 2017.
- 2) David F, Gilles F, André D et al. : Otitis media in dairy calves:A retrospective study of 15 cases (1987 to 2002), *Can Vet J*, 45: 661-666. 2004.
- 3) J. Classen, A. Bruehschwein, A. Meyer-Lindenberg et al. : Comparison of ultrasound imaging and video otoscopy with cross-sectional imaging for the diagnosis of canine otitis media, *Vet J*, 217: 68-71. 2016.
- 4) A. Finnen, L. Blond, D. Francoz et al. : Comparison of Computed Tomography and Routine Radiography of the Tympanic Bullae in the Diagnosis of Otitis Media in the Calf, *J Vet Intern Med*, 25: 143-147. 2011.
- 5) Jerome VB, Gillian A. P, Brett W et al. : Clinical Signs, Computed Tomographic Imaging, and Management of Chronic Otitis Media/Interna in Dairy Calves, *J Vet Intern Med*, 18: 907-910. 2004.
- 6) 北山篤, 黒岩武信, 坂田学ら：難治性中耳炎の黒毛和種肥育牛における鼓室胞切開術のための画像診断学的アプローチ, *家畜診療*, 67(9): 541-547. 2020.
- 7) Maeda T, Shibahara T, Kimura K et al. : Mycoplasma bovis-associated Suppurative Otitis Media and Pneumonia in Bull Calves, *Journal of Comparative Pathology*, 129: 100-110. 2003.
- 8) Forrest LJ: The cranial and nasal cavities. Canine and feline, *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*, 4th ed. :78-80, WB Saunders, Philadelphia. 2002.

山口獣医学雑誌投稿規程

- 1 山口獣医学雑誌（以下、「雑誌」という。）に関する原稿の取り扱い、この規程による。
- 2 原稿は、Microsoft Word等のコンピューターソフトを用いて作成し、原稿（図表等を含む）の電子ファイルを学会事務局へ電子メールの添付書類にて提出する。電子メールで送信できない場合は、プリントアウトした原稿2部（図表等を含む）とそれらのファイルを保存したCD-ROM等を学会事務局あて送付する。
- 3 原稿は、編集委員会において審査し、原稿の採否及び掲載の順位は、編集委員会が決定する。ただし、編集委員会は、内容に応じて専門家に原稿の審査を依頼することができる。また、審査の過程で著者への修正を求め、再審査を行うことがある。
- 4 審査の結果、採用と認められた原稿は、雑誌の印刷発刊後においても、原則として著者へ返却しない。
- 5 審査の結果、不採用と認められた原稿は、原則として、受付3か月以内に返却する。ただし、この場合、不採用の理由を明らかにする義務を負わない。
- 6 原稿は、原則として、刷り上がり6ページ（1ページ約2,400字）以内とする。制限ページ数を超過した分およびカラー写真については、著者実費負担とすることがある。ただし、編集委員会の依頼による総説論文の原稿は、この限りではない。
- 7 原稿は、表紙、和文・英文抄録、キーワード、文献、図表の説明等に分けて書く。
 - (1)電子ファイルのフォーマット：A4版用紙に横書き、1行40字×30行（目安）、明朝体12ポイントで、フッター中央にページ番号を記載する。
 - (2)表紙：原稿の種類、論文表題、著者名、所属施設ならびにこれらの英訳の順に記載する。下段に連絡著者の連絡先（氏名、住所、電話・FAX番号、電子メールアドレス）を明記する。
 - (3)和文・英文抄録：抄録は和文、英文ともに刷り上がり1ページ以内とする。和文と英文の要約の後に、原著で5語以内、短報では3語以内のキーワードを記載する。
- 8 図表並びに写真は、まとめて原稿の最後につけ、論文中にそれらを置く位置を指定する。
- 9 引用文献は、本文に引用したものに限り、著者名、論文題名、雑誌名、巻（号）、始頁～終頁、西暦年を明記し、原則としてアルファベット順に配列し、番号をつけ、下記の様式で記載する。

例 雑誌

和文： 5) 松本正弘・中村一夫：人および動物血液中の日本脳炎ウイルス中和抗体の分布と推移について、熱帯医学, 15 (6) : 272-285. 1975.

英文： 18) Lawrence J. E. and Clark, D. H. : The Lysis of Leptospire by Antiserum. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 24 (2) : 250-260. 1975.

単行本

和文： 7) 山村雄一・石坂公成：免疫化学概論, 2版：15-18. 朝倉書店, 東京. 1973.

英文： 15) Smith, H. A., Jones, T. C. and Hunt, R. D. : Veterinary Pathology. 4th ed. Lea & Febiger Pub., Philadelphia. U.S.A. 1972.
- 10 外国人名、地名などは原語のまま記述し、数字は算用数字、度量衡はメートル法による。
- 11 印刷の校正は編集委員が行う。ただし、初校は著者も行うものとし、この場合、原則として、内容の訂正は認めない。
- 12 別刷は、100部まで無償で贈呈する。それ以上の部数については、著者実費負担とする。必要部数については、初校（著者校正）のとき、原稿の右上端に朱書するものとする。
- 13 掲載論文の著作権及び電子的形態による利用も含めた包括的な著作権は、公益社団法人山口県獣医師会に帰属する。
- 14 この規程の改廃は、編集委員会において決定する。

附 則

- 1 この規程は、平成24年12月13日から施行する。（第3項、第16項、第17項改正）
- 2 この規程は、平成31年3月19日から施行する。（第2項、第6項～第17項改正）
- 3 この規程は、令和4年5月12日から施行する。

山口獣医学雑誌編集内規

第1条 山口獣医学雑誌は、原則として毎年度、定期刊行する。

第2条 編集は家畜衛生、小動物医療、獣医公衆衛生及び関連領域の総説、原著、短報、資料等で会員等の寄稿原稿及び学会の依頼原稿について行う。

ただし、会員外の者が筆頭著者の場合は、投稿料20,000円を徴収する。

第3条 学会長は、学会運営委員の中から編集委員若干名を委嘱し、委員会を設置する。

第4条 学会長は、学会事務局に発刊、配付、寄贈、交換、広告取得等の事務を担当させる。

第5条 委員の任期は2年とする。ただし、再任を妨げない。

第6条 編集委員会

- (1) 委員会は、学会長が必要に応じて招集する。
- (2) 委員長並びに副委員長は、委員の互選による。
- (3) 委員会は、寄稿原稿の採否について審査する。
- (4) 委員会は、発行部数を決定する。

第7条 内規に定めない事項は、編集委員会において決定する。

第8条 内規の改廃については、編集委員会において決定する。

附 則

- 1 この内規は、昭和54年（1979年）10月13日から実施する。
- 2 平成22年11月18日一部改正（第1条、第2条、第8条）
- 3 平成24年12月13日一部改正（第2条、第3条、第6条、第8条）
- 4 平成31年3月19日一部改正（第1条、第8条）

山口県獣医師会関係事業および刊行物

事業概要

獣医学術の振興・普及・獣医療技術の向上，獣医事の適正化，動物愛護精神の高揚を基調として，畜産の振興，公衆衛生の向上並びに動物保健衛生の向上に関する事業を行い，人と動物による健全かつ豊かな生活と公共福祉の増進に寄与する。

学会・講習会・研修会

山口県獣医学会

1962年第1回開催，毎年1回開催，2022年現在，第58回学会を終了。

講習会・研修会

産業動物，小動物，獣医公衆衛生並びに同関係の講習・研修会を県獣医師会主催で開催するほか，中国地区獣医師会連合会，公益社団法人日本獣医師会，農林水産省，厚生労働省等との共催，後援等により年5～6回実施。

刊行物

[定期刊行物]

・山口県獣医師会会報

1961年6月創刊，毎月1回発行，現在（2022年12月）第739号を発刊。機関事業・方針，提言・要望，学会・学術情報・広報・行事開催，一般公開情報，関連統計等を登載。

・山口獣医学雑誌

1974年1月創刊，毎年1回発行，現在（2022年12月）第49号を発刊。和文，英文の総説，原著，症例報告，短報等，論文を登載。山口県獣医学会の機関誌として内外の学術誌と交換。

・山口県獣医学会抄録

毎年8月発刊

・研修・講習会テキスト

[不定期刊行物]

・技術マニュアル

・事業実施マニュアル

・創立記念号

30年の歩み，50年の歩み等

山口獣医学雑誌

第49号

2022年12月発行

編集委員長 度会雅久 編集委員 野村恭晴
奥田 優
下田 宙
谷 健二
柳澤郁成

発行責任者 公益社団法人 山口県獣医師会
会長理事 田中 尚秋
〒754-0002
山口県山口市小郡下郷1080番地3
TEL (083) 972-1174
FAX (083) 972-1554
E-mail yama-vet@abeam.ocn.ne.jp
http://www.yamaguchi-vet.or.jp

印刷所 コロニー印刷
山口県防府市大字台道10522番地

THE YAMAGUCHI JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

No. 49

DECEMBER

2022

CONTENTS

REVIEW

Hazard Analysis and Critical Control Point

Hajime TOYOFUKU 1 ~ 10

ORIGINAL ARTICLE

Research on serotypes and pathogenicity-related genes in EHEC from bovine feces

Kenta WATANABE, Nao NISHINAKMA, Hiroko KIYOTA,
Natsumi MIZUMA, Masahisa WATARAI 11 ~ 18

Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) on Large Cattle Farms and Countermeasures

Yuki OHYAMA, Mitsuhiko KAMEYAMA 19 ~ 24

CLINICAL CASE

Mucinous biliary carcinoma in a cat suspected with gallbladder mucocele.

Tomoya HARAGUCHI, Nozomi SHIMONOHARA, Tomoko OKUSA, Takato ITO,
Kanao TSUJI, Tokiyo ITAMOTO, Miho WAKIMOTO, Yuri YAMASHITA,
Akane IKI, Megumi OKISHIO, Naomasa NITTA 25 ~ 30

DOCUMENTATION

Investigation of imaging direction using digital radiography for otitis media in calves

Yumi FUJIWARA, Tetsuya TAKEYAMA, Yuki KUNISADA, Tomochika SOTOKAWA
Yasuho TAURA, Naoki SASAKI 31 ~ 36