

平成27年3月18日

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 研究実績報告書

課題番号：2402

肉用牛農場における腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター低減技術の開発

研究期間：平成24年度～平成26年度（3年間）

研究総括者名：伊藤 武

試験研究機関名：一般財団法人東京顕微鏡院  
株式会社三菱総合研究所

## I. 全体計画

### 1. 研究目的

肉用牛、肉用牛農場、周辺環境やと畜場での腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染実態を調査・把握し、同病原菌の農場環境での動態・汚染の伝播を解析し、衛生管理手法や生菌剤などの対策を講じることによって同病原菌の汚染低減を確認し、安全な食肉の提供のための適切な飼育管理方法を検討する。現在使われているガイドラインやマニュアル等の改良や科学的データによる裏づけを行い、生産農家に衛生対策の効果を周知してもらう基礎データを作成する。

また、本研究にて得られたデータ及び過去に報告されているデータから、確率論的モデルを作成し、農場での管理と市場に流通する牛肉との関連性を明確にして、衛生管理の有効性を明らかにするとともに、リスク管理のための基礎データの作成を行う。

### 2. 研究内容

#### (1) 中課題1：腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染実態調査

##### 1) 小課題1 肉用牛農場の汚染実態調査【東京顕微鏡院】

肉用牛個体、飼育環境、ハエ、飼料、飲用水、作業機具・器材等の農場環境の腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及び大腸菌を定性及び定量法にて検査し、農場の汚染実態及び実施されている衛生対策の効果について検討を行う。

初年度はA県近郊の20農場程度を対象に汚染実態調査を実施し、その結果をうけて衛生対策の導入を実施する農場を決定する。2年目以降は衛生状態のモニタリングと統計解析の基礎データの収集のために定期的な汚染実態調査を行う。

##### 2) 小課題2 と畜場での汚染実態調査【東京顕微鏡院】

肉用牛個体の体表、腸内容物及びと畜場の環境等を農場同様に検査し、農場での衛生管理との関連についての検討を行う。

汚染実態調査を実施している農場の肉用牛がと畜された後の枝肉、腸内容物及び体表等を対象に汚染実態調査を行い、汚染の有無・菌数の変化等の調査を行う。

#### (2) 中課題2：分離菌株の解析による動態・汚染の伝播の解析【東京顕微鏡院】

汚染実態調査によって分離された菌株を、疫学解析手法を用いて解析し、汚染経路・伝播について解析を行い、衛生対策につながるデータを作成する。

#### (3) 中課題3：新たな衛生対策の導入とその効果の検証【東京顕微鏡院】

汚染実態調査及び疫学解析の結果を踏まえ、衛生管理ハンドブックや農場HAC

C P等の衛生対策の再構築を図り、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及び大腸菌を定量法にて検査し、その効果を検証する。

(4) 中課題4：微生物制御物質（生菌剤等）の投与による肉用牛腸内の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの影響評価【東京顕微鏡院】

生菌を含む飼料添加物等の製品が農場にて用いられているが、それらの影響について科学的に比較検討を実施する。繁殖・肥育農場において3種類の製品を投与し、糞便中の腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及び大腸菌を定量的に検査することにより、製品の投与による影響の比較、投与時期や投与期間について検討を行う。

(5) 中課題5：肉用牛と牛肉の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター保有の関連性に関する調査【(株) 三菱総合研究所】

国際機関である Codex 委員会では、微生物学的リスクアセスメントの手法として確率論的モデルが適用されている。このため、さまざまな食中毒菌に関する新たな規格基準や衛生管理措置を設定（あるいはその有効性を分析）する際、確率論的モデルによるリスクアセスメントが、わが国を含め、グローバルスタンダードとして実施されている。そこで、本研究では肉用牛と牛肉の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター保有の関連性を、確率論的モデルを構築することで分析する。

1) ロジックモデルの検討と必要データの整理

腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターについて、農場段階における農場の汚染（農場汚染率）や肉用牛の汚染（保有率、保有量）が、と畜・加工段階を経て流通・小売段階における牛肉（内臓肉を含む）の汚染（保有率、保有量）をもたらすプロセスを論理的に記述したロジックモデルを検討する。そして、このロジックモデルに基づいて確率論的モデルとして構築するために必要となるデータを整理する。

2) 確率論的モデル構築に利用可能なデータの整理

(1) で検討した基本モデルに適用可能なデータとして、肉用牛農場及び肉用牛の消化管内の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染実態、牛肉の汚染実態等の本研究で得られた（得られる見込みの）データ及び過去に報告されているデータ等を収集し整理する。そして、不足するデータについて代替データ等の探索と活用可能性を検討する。また、必要に応じて合目的性を失わない範囲で基本モデルを修正する。

### 3) 確率論的モデルの構築

(1) で検討したロジックモデルに (2) で整理したデータを適用し、肉用牛と牛肉の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター保有の関連性を確率論的にモデル化する。そして、現状の肉用牛の汚染状況から現状の牛肉の汚染状況を再現できるようモデルのパラメータを推定することで確率論的モデルを構築する。なお、確率論的モデルは Microsoft Excel 上でモンテカルロシミュレーションを実行するアドインソフト (Palisade 社の @Risk 日本語版) によって記述する。

### 4) 生産衛生管理の有効性の分析

腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターについて、中課題 1～4 で検証した飼育管理による汚染低減効果や微生物制御物質による抑制効果あるいは両者の組み合わせなどの効果を、(3) で構築した確率論的モデルにおける農場段階の農場及び肉用牛の汚染状況に反映させ、モンテカルロシミュレーションを実行し、それぞれのケースにおける牛肉の汚染状況を推定することで、生産衛生管理による牛肉の汚染や食中毒リスク減少に及ぼす効果を推定する。

### 3. 年次計画

| 項目                                                  | 平成24年度                         | 平成25年度                   | 平成26年度    |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------|
| 1. 腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染実態調査<br>(1) 肉用牛農場の汚染実態調査    | 汚染実態調査（東京顕微鏡院）<br>←            |                          | →         |
| (2) と畜場での汚染実態調査                                     | 汚染実態調査（東京顕微鏡院）<br>←            |                          | →         |
| 2. 分離菌株の解析による動態・汚染の伝播の解析                            | 分離菌株の疫学解析（東京顕微鏡院）<br>←         |                          | →         |
| 3. 新たな衛生対策の導入とその効果の検証                               | 衛生対策の導入と効果の検証（東京顕微鏡院）<br>←     |                          | →         |
| 4. 微生物制御物質（生菌剤等）の投与による肉用牛腸内の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの影響評価 | 各種製品の投与とその影響の評価（東京顕微鏡院）<br>←   |                          | →         |
| 5. 肉用牛と牛肉の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター保有の関連性に関する調査            | ロジックモデル検討・データの整理（三菱総合研究所）<br>← |                          | →         |
| (1) ロジックモデルの検討と必要データの整理                             |                                |                          |           |
| (2) 確率論的モデル構築に利用可能なデータの整理                           | データの収集・整理（三菱総合研究所）<br>←        |                          | →         |
| (3) 確率論的モデルの構築                                      |                                | 確率論的モデルの構築（三菱総合研究所）<br>← | →         |
| (4) 有効性の分析                                          |                                | 有効性の分析（三菱総合研究所）<br>←     | →         |
| 所要経費（合計）                                            | 12,000 千円                      | 11,900 千円                | 11,500 千円 |

#### 4. 実施体制

| 項目                                                  | 担当研究機関     | 研究担当者                                       | エフォート<br>(%)     |
|-----------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------|------------------|
| 研究総括者                                               | (一財)東京顕微鏡院 | 伊藤 武                                        | 10               |
| 1. 腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染実態調査                        | (一財)東京顕微鏡院 | ○ 遠山一郎（平成24年5月～平成25年3月）<br>伊藤 武（平成25年4月～）   | 前出               |
| (1) 肉用牛農場の汚染実態調査                                    | (一財)東京顕微鏡院 | △ 和田 真太郎                                    | 30               |
| (2) と畜場での汚染実態調査                                     | (一財)東京顕微鏡院 | △ 森 哲也                                      | 30               |
| 2. 分離菌株の解析による動態・汚染の伝播の解析                            | (一財)東京顕微鏡院 | ○ 鄒 碧珍<br>横田 春海<br>岸野 かなえ                   | 20<br>10<br>10   |
| 3. 新たな衛生対策の導入とその効果の検証                               | (一財)東京顕微鏡院 | ○ 森 哲也（平成24年5月～平成26年3月）<br>和田 真太郎（平成26年4月～） | 前出               |
| 4. 微生物制御物質（生菌剤等）の投与による肉用牛腸内の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの影響評価 | (一財)東京顕微鏡院 | ○ 和田 真太郎                                    | 前出               |
| 5. 肉用牛と牛肉の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター保有の関連性に関する調査            | (株)三菱総合研究所 | ○ 長谷川 専<br>松下 知己<br>大橋 毅夫<br>柿沼 美智留         | 2<br>1<br>2<br>5 |

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

## Ⅱ．研究実績報告

### 中課題 1：腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染実態調査【東京顕微鏡院】

#### (1) 成果の概要

| 工程表                                                                                                             | 進捗状況・成果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 小課題 1．肉用牛農場の汚染実態調査<br>(1) 農場での汚染実態調査<br>肉用牛の直腸便を採取して、腸管出血性大腸菌 O157 及びカンピロバクターの汚染実態を把握する。(小課題 1 関連) 平成 24、25 年度) | <p>A 県及び B 県の肉用牛農場計 27 農場(平成 24 年度は 20 農場、及び平成 25 年度は 7 農場) から各 10 頭の直腸便を採取し、腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) 及びカンピロバクターを定性検査した結果、研究対象農場における O157 及びカンピロバクターの汚染実態を把握できた(表 1-1)。(平成 24～25 年度)</p> <p>※ 1</p> <p>O157 が陽性となった 14 検体(直腸便、3 農場に由来)を対象に最確数法による定量試験を実施した。14 検体のうち、6 割以上が 100CFU/100 g 以下であったが、非常に菌数の高い検体も認められた。(平成 25 年度)</p> <p>※ 2</p> <p>調査対象の肉用牛農場は混合飼料である a 剤(原材料は精製木酢酸等)を定期的を使用しているグループ(グループ 1)と使用していないグループ(グループ 2)の 2 グループに分けることができるため両グループの O157 及びカンピロバクターの汚染実態を比較した(表 1-3)(平成 24～25 年度)。</p> <p>※ 3</p> <p>汚染実態調査において O157 が検出された農場のうち 2 農場(G 及び T 農場)を対象に、G 農場は 5 頭、T 農場は 6 頭の肉用牛直腸便、飼育環境、飼料、使用水の O157 及びカンピ</p> |





カンピロバクターが陽性となった22農場のうち、1頭陽性が3農場、2頭陽性が2農場、3頭陽性が1農場、4頭陽性が3農場、5頭陽性が3農場、6頭陽性が3農場、7頭陽性が3農場、9頭陽性が3農場そして10頭陽性が1農場であった（表1－1）。

今回調査を実施した27農場ではO157及びカンピロバクター両菌での汚染が確認された農場が10農場、O157のみ陽性が2農場、カンピロバクターのみ陽性が12農場、そしてどちらも陰性であった農場は3農場であった。

表1－1．肉用牛農場汚染実態調査結果

| 区分              | 農家<br>番号 | 名 前 | 採材日                   | O157<br>陽性 | カンピロバクター<br>陽性 |
|-----------------|----------|-----|-----------------------|------------|----------------|
| グループ1<br>a剤 使用群 | 1        | A農場 | H24.9.5               | 1/10       | 5/10           |
|                 | 2        | B農場 | H24.9.10              | 10/10      | 0/10           |
|                 | 3        | C農場 | H24.8.20              | 0/10       | 7/10           |
|                 | 4        | D農場 | H24.8.31              | 0/10       | 1/10           |
|                 | 5        | E農場 | H24.9.10              | 0/10       | 0/10           |
|                 | 6        | F農場 | H24.8.18              | 0/10       | 7/10           |
|                 | 7        | G農場 | H24.9.6               | 5/10       | 10/10          |
|                 | 8        | H農場 | H24.9.8               | 2/10       | 6/10           |
|                 | 9        | I農場 | H24.9.8               | 0/10       | 1/10           |
|                 | 10       | J農場 | H24.9.3               | 0/10       | 5/10           |
|                 | 11       | K農場 | H24.9.26              | 0/10       | 6/10           |
|                 | 12       | L農場 | H24.10.1              | 0/10       | 2/10           |
|                 | 13       | M農場 | H24.8.28              | 0/10       | 5/10           |
|                 | 14       | N農場 | H24.9.1               | 2/10       | 4/10           |
| グループ2           | 15       | O農場 | H24.8.26              | 0/10       | 4/10           |
|                 | 16       | P農場 | H24.9.4               | 1/10       | 9/10           |
|                 | 17       | Q農場 | H24.8.26              | 0/10       | 9/10           |
|                 | 18       | R農場 | H24.9.1               | 1/10       | 4/10           |
|                 | 19       | S農場 | H24.9.4               | 3/10       | 2/10           |
| 繁殖              | 20       | T農場 | H24.9.17              | 5/10       | 0/10           |
| グループ2           | 21       | a農場 | H25.10.7              | 7/10       | 9/10           |
|                 | 22       | b農場 | H25.10.31             | 0/10       | 7/10           |
|                 | 23       | c農場 | H25.11.5              | 4/10       | 3/10           |
|                 | 24       | d農場 | H25.11.7<br>H25.12.5  | 0/11       | 0/11           |
|                 | 25       | e農場 | H25.11.6<br>H25.11.13 | 0/10       | 1/10           |
|                 | 26       | f農場 | H25.12.9              | 3/10       | 6/10           |
|                 | 27       | g農場 | H26.2.12              | 0/10       | 0/10           |

※2：農場の汚染実態調査 O157 定量試験

3農場14検体の直腸便中のO157菌数を示した。100gあたり<30CFU以下（検出限界以下）の検体が5検体、36CFUが、4検体、230CFUが3検体、1,100CFUが1検体、そし

て、1,100CFU以上が1検体であった。O157陽性検体の6割以上が100CFU以下であったが、非常に菌数の高い牛も認められた（表1－2）。

表1－2．O157 定量試験結果

| 農場   | 検体数 | 菌数(CFU/100g)                   |
|------|-----|--------------------------------|
| a 農場 | 7   | <30、<30、36、36、230、1,100、>1,100 |
| c 農場 | 4   | <30、36、230、230                 |
| f 農場 | 3   | <30、<30、36                     |

### ※3：肉用牛農場汚染実態調査

汚染実態調査の結果、27農場、271頭のうち、O157は12農場(44%)、44頭(16%)が陽性、カンピロバクターは22農場(81%)、113頭(42%)が陽性となった（表1－3）。

調査した27農場では、繁殖経営が、1農場、一貫経営が1農場、そして肥育経営が25農場であった。また、一貫及び肥育経営の26農場は、a剤を飼養段階で用いている農場（グループ1）と通常の飼料のみで使用している農場（グループ2）に分けることができる。各グループの比率は、グループ1が14農場、グループ2が12農場であった。この両グループ間でのO157及びカンピロバクターの汚染の有意差を検討したところ、有意差は認められなかった。

表1－3．肉用牛農場汚染実態調査 結果まとめ

|                   | 農場数 | 個体数 | 農場             |                    | 個体             |                    |
|-------------------|-----|-----|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
|                   |     |     | O157<br>陽性数(%) | カンピロバクター<br>陽性数(%) | O157<br>陽性数(%) | カンピロバクター<br>陽性数(%) |
| グループ1<br>(a剤 使用群) | 14  | 140 | 5(36%)         | 12(86%)            | 20(14%)        | 59(42%)            |
| グループ2             | 12  | 121 | 6(50%)         | 10(83%)            | 19(16%)        | 54(45%)            |
| 繁殖農家              | 1   | 10  | 1(100%)        | 0(0%)              | 5(50%)         | 0(0%)              |
| 合計                | 27  | 271 | 12(44%)        | 22(81%)            | 44(16%)        | 113(42%)           |

### ※4：農場環境調査（平成24年度）

汚染実態調査でO157が陽性となったG農場（10頭中5頭陽性）及びT農場（10頭中5頭陽性）の2農場を対象とした農場環境調査（平成24年度）を実施した。なお、G農場で調査した牛5頭は、すべて汚染実態調査の対象牛と異なる個体であった。一方、T農場で調査した6頭のうち1頭は、汚染実態調査の対象牛と同一個体であり、残り5頭は異な

る個体であった。

調査の結果、O157はG農場の土壌（菌数：73CFU/100g）及びT農場の敷料（菌数：＜30CFU/100g）の2検体が陽性となり、肉用牛の直腸便からは検出されなかった。カンピロバクターはG農場の肉用牛の直腸便3検体及び敷料1検体、T農場の肉用牛の直腸便1検体が陽性となった（表1－4）。

肉用牛の直腸便でO157が陰性となったが、本調査は2月に実施をしており（汚染実態調査はG、T農場ともに9月に実施）、季節的な要因でO157が検出できなかった可能性も考えられる。

表1－4．平成24年度農場環境調査結果

| 検体番号 | 採材日      | 農場  | 検体情報 |                    | O157 | O157菌数<br>100gあたり | カンピロ<br>バクター |
|------|----------|-----|------|--------------------|------|-------------------|--------------|
| 1    | H25.2.19 | G農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | +            |
| 2    | H25.2.19 | G農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | +            |
| 3    | H25.2.19 | G農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | -            |
| 4    | H25.2.19 | G農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | +            |
| 5    | H25.2.19 | G農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | +            |
| 6    | H25.2.19 | G農場 | 飼料   | ストロー（肥育中牛房、直置き）    | -    | NT                | -            |
| 7    | H25.2.19 | G農場 | 飼料   | ストロー（出荷直前牛房、直置き）   | -    | NT                | -            |
| 8    | H25.2.19 | G農場 | 飼料   | チモシー（導入直後牛房、直置き）   | -    | NT                | -            |
| 9    | H25.2.19 | G農場 | 飼料   | 濃厚飼料（給餌前、保管中）      | -    | NT                | -            |
| 10   | H25.2.19 | G農場 | 敷料   | 出荷直前牛 手前の牛房 餌通路付近  | -    | NT                | -            |
| 11   | H25.2.19 | G農場 | 敷料   | 出荷直前牛 手前の牛房 水付近    | -    | NT                | -            |
| 12   | H25.2.19 | G農場 | 敷料   | 肥育中牛 2番目の牛房 餌通路付近  | -    | NT                | -            |
| 13   | H25.2.19 | G農場 | 敷料   | 出荷直前牛 2番目の牛房 餌通路付近 | -    | NT                | +            |
| 14   | H25.2.19 | G農場 | 土壌   | 入口右側               | -    | NT                | -            |
| 15   | H25.2.19 | G農場 | 土壌   | 入口左側               | +    | 73/100g           | -            |
| 16   | H25.2.19 | G農場 | 飲用水  | 肥育中牛               | -    | NT                | -            |
| 17   | H25.2.19 | G農場 | 飲用水  | 出荷直前牛              | -    | NT                | -            |
| 18   | H25.2.19 | G農場 | 水道水  | 牛舎蛇口               | -    | NT                | -            |
| 21   | H25.2.19 | T農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | -            |
| 22   | H25.2.19 | T農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | -            |
| 23   | H25.2.19 | T農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | +            |
| 24   | H25.2.19 | T農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | -            |
| 25   | H25.2.19 | T農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | -            |
| 26   | H25.2.19 | T農場 | 肉用牛  | 直腸便                | -    | NT                | -            |
| 27   | H25.2.19 | T農場 | 飼料   | 濃厚飼料（親子牛房、箱入り）     | -    | NT                | -            |
| 28   | H25.2.19 | T農場 | 飼料   | 濃厚飼料（給餌前、保管中）      | -    | NT                | -            |
| 29   | H25.2.19 | T農場 | 飼料   | 粗飼料（ストロー他、母牛房、直置き） | -    | NT                | -            |
| 30   | H25.2.19 | T農場 | 敷料   | 母牛房                | -    | NT                | -            |
| 31   | H25.2.19 | T農場 | 敷料   | 親子牛房               | +    | <30/100g          | -            |
| 32   | H25.2.19 | T農場 | 土壌   | 入口右                | -    | NT                | -            |
| 33   | H25.2.19 | T農場 | 土壌   | 入口左                | -    | NT                | -            |
| 34   | H25.2.19 | T農場 | 水道水  | 井戸水                | -    | NT                | -            |

＋：検出

－：検出せず

NT：試験せず

#### ※5：農場環境調査（平成25年度）

T農場のハエ（5匹を1検体）を対象にO157の検査を行い、1検体が陽性となった（表1－5）。ハエの採取はT農場にハエとりリボンを設置し、そこで付着したハエを検査に用いた。

表 1－5．平成 25 年度農場環境調査結果

| 検体番号 | 採材日     | 農場  | 検体情報 | O157     |
|------|---------|-----|------|----------|
| 1    | H25.7.8 | T農場 | ハエ1  | ハエ5匹を1検体 |
| 2    | H25.7.8 | T農場 | ハエ2  | ハエ5匹を1検体 |
| 3    | H25.7.8 | T農場 | ハエ3  | ハエ5匹を1検体 |
| 4    | H25.7.8 | T農場 | ハエ4  | ハエ5匹を1検体 |
| 5    | H25.7.8 | T農場 | ハエ5  | ハエ5匹を1検体 |

＋：検出

－：検出せず

#### ※6：農場環境調査（平成 26 年度）

農場環境調査の結果、O157 は M 農場の肉用牛直腸便 2 検体、敷料 1 検体及びハエ 2 検体（1 匹を 1 検体）が陽性となった。カンピロバクターは今回の調査ではすべて陰性であった。O157 菌数は直腸便の 2 検体は 30CFU 未満、及び 30CFU/100 g、敷料は 2400CFU/100 g であった(表 1－6)。ハエは検体量が少量なため、定性試験のみ実施した。

農場環境調査（平成 25 年 2 月、平成 26 年 7 月）を実施した G、M 及び T 農場は、平成 24 年 8～9 月に汚染実態調査を実施している。G 農場は、平成 24 年 9 月の調査で O157 が 10 頭中 5 頭陽性、カンピロバクターが 10 頭すべて陽性であった。平成 25 年 2 月の調査では O157 が 5 頭すべて陰性、カンピロバクターは 5 頭中 4 頭陽性、本調査（平成 26 年 7 月）では 2 頭とも O157・カンピロバクター陰性であった。M 農場は、平成 24 年 8 月の調査で O157 が 10 頭すべて陰性、カンピロバクターが 10 頭中 5 頭陽性であった。本調査では O157 が 2 頭中 2 頭陽性、カンピロバクターは 2 頭ともに陰性であった。T 農場は、平成 24 年 9 月の調査で O157 が 10 頭中 5 頭陽性、カンピロバクターは 10 頭すべて陰性であった。平成 25 年 2 月の調査では、O157 が 5 頭すべて陰性、カンピロバクターは 5 頭中 1 頭陽性であった。さらに、平成 25 年 2 月の調査において T 農場で直腸便を採取した 5 頭のうち、1 頭は平成 24 年 9 月の調査でも直腸便を採取されており、その個体の結果は、平成 24 年 9 月に O157 陽性、カンピロバクター陰性であったが、平成 25 年 2 月の調査では O157 陰性、カンピロバクター陰性であった。

感染牛の O157 やカンピロバクターの糞便への排出は継続せず、一時的または断続的との報告<sup>1-3</sup>がある。また、中課題 4 の試験における微生物制御物質等の非給与グループの牛をみると、一時的または断続的に O157 やカンピロバクターを排出している個体がある（表 4－1、4－2、4－5、4－6）。

<sup>1</sup> 秋庭正人ら 牛における大腸菌 O157：H7 の保有状況 感染症誌 1998；72：167-8.

<sup>2</sup> 農林水産省食品安全セミナー資料 2-3.「牛肉の腸管出血性大腸菌汚染低減に向けた取組」  
[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_manage/seminar/pdf/siryou2-3\\_cattle-stec.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_manage/seminar/pdf/siryou2-3_cattle-stec.pdf)

<sup>3</sup> Sproton ら. Temporal Variation and Host Association in the *Campylobacter* Population in a Longitudinal Ruminant Farm Study. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep; 77(18): 6579–6586.

この調査の結果においても、O157 感染牛やカンピロバクター感染牛は排菌と非排菌を繰り返していることが示唆された。

また、農場環境調査（平成 24、26 年度）の結果から、排菌した O157 やカンピロバクターが敷料、土壌及びハエに伝播していることが確認され、これらの環境が次の感染源となる可能性が示唆された。

表 1－6．平成 26 年度農場環境調査結果

| 番号 | 採材日      | 農場  | 検体名             | O157 | O157菌数<br>100gあたり | カンピロバクター | 大腸菌<br>(CFU/g) | 腸内細菌科<br>(CFU/g) |
|----|----------|-----|-----------------|------|-------------------|----------|----------------|------------------|
| 1  | H26.7.22 | G農場 | 肉用牛1 直腸便        | -    | NT                | -        | 8.0E+06        | 1.1E+07          |
| 2  | H26.7.22 | G農場 | 肉用牛1 ふき取り(ST25) | -    | NT                | -        | 4.0E+06        | 7.3E+05          |
| 3  | H26.7.22 | G農場 | 肉用牛1 ふき取り(ガーゼ)  | -    | NT                | -        | 2.6E+07        | 1.6E+07          |
| 4  | H26.7.22 | G農場 | 肉用牛2 直腸便        | -    | NT                | -        | 2.0E+04        | 5.0E+04          |
| 5  | H26.7.22 | G農場 | 肉用牛2 ふき取り(ST25) | -    | NT                | -        | 3.0E+06        | 4.0E+06          |
| 6  | H26.7.22 | G農場 | 肉用牛2 ふき取り(ガーゼ)  | -    | NT                | -        | 1.2E+07        | 1.3E+07          |
| 7  | H26.7.22 | G農場 | 敷料 出荷牛房(直腸便採取)  | -    | NT                | -        | 8.0E+02        | 1.4E+05          |
| 8  | H26.7.22 | G農場 | 敷料 肥育中牛房        | -    | NT                | -        | 4.0E+04        | 5.0E+06          |
| 9  | H26.7.22 | G農場 | 土壌              | -    | NT                | -        | 2.0E+02        | 2.0E+06          |
| 10 | H26.7.22 | G農場 | 水               | -    | NT                | -        | 1.0E+01        | 1.0E+01          |
| 11 | H26.7.22 | G農場 | ハエ1             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 12 | H26.7.22 | G農場 | ハエ2             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 13 | H26.7.22 | G農場 | ハエ3             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 14 | H26.7.22 | G農場 | ハエ4             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 15 | H26.7.22 | G農場 | ハエ5             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 16 | H26.7.22 | M農場 | 肉用牛1 直腸便        | +    | <30               | -        | 3.0E+06        | 9.2E+05          |
| 17 | H26.7.22 | M農場 | 肉用牛1 ふき取り(ST25) | -    | NT                | -        | 1.0E+04        | 1.0E+08          |
| 18 | H26.7.22 | M農場 | 肉用牛1 ふき取り(ガーゼ)  | -    | NT                | -        | 3.2E+07        | 1.0E+08          |
| 19 | H26.7.22 | M農場 | 肉用牛2 直腸便        | +    | 30                | -        | 2.0E+06        | 2.0E+06          |
| 20 | H26.7.22 | M農場 | 肉用牛2 ふき取り(ST25) | -    | NT                | -        | 1.2E+05        | 1.1E+06          |
| 21 | H26.7.22 | M農場 | 肉用牛2 ふき取り(ガーゼ)  | -    | NT                | -        | 2.3E+08        | 1.9E+08          |
| 22 | H26.7.22 | M農場 | 敷料 出荷牛房(直腸便採取)  | -    | NT                | -        | 2.0E+06        | 4.0E+06          |
| 23 | H26.7.22 | M農場 | 敷料 出荷牛房         | -    | NT                | -        | 7.8E+05        | 1.0E+07          |
| 24 | H26.7.22 | M農場 | 敷料 肥育中牛房        | -    | NT                | -        | 7.6E+05        | 2.0E+07          |
| 25 | H26.7.22 | M農場 | 敷料 肥育中牛房        | +    | 2400              | -        | 2.0E+05        | 1.5E+07          |
| 26 | H26.7.22 | M農場 | 土壌 肥育牛舎前        | -    | NT                | -        | 1.0E+05        | 2.5E+07          |
| 27 | H26.7.22 | M農場 | 土壌 育成牛舎前        | -    | NT                | -        | 5.0E+03        | 7.0E+07          |
| 28 | H26.7.22 | M農場 | 水               | -    | NT                | -        | 0.0E+00        | 3.0E+02          |
| 29 | H26.7.22 | M農場 | ハエ1             | +    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 30 | H26.7.22 | M農場 | ハエ2             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 31 | H26.7.22 | M農場 | ハエ3             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 32 | H26.7.22 | M農場 | ハエ4             | +    | NT                | -        | NT             | NT               |
| 33 | H26.7.22 | M農場 | ハエ5             | -    | NT                | -        | NT             | NT               |

＋：検出

－：検出せず

NT：試験せず

#### ※ 7：と畜場 A での体表汚染状況

肉用牛 9 頭における体表の汚染状況を表 1－7 に示した。9 頭のふき取り検体から、O157 及びカンピロバクターは検出されなかった。腸内細菌科菌群は、9 頭の平均（相加平均）が  $3.7 \times 10^6 \text{cfu}/25\text{cm}^2$  であり、最小値  $5.0 \times 10^3 \text{cfu}/25\text{cm}^2$  から最大値  $2.2 \times 10^7 \text{cfu}/25\text{cm}^2$  と個体差が大きいと考えられた。

表 1－7. と畜場での体表ふき取り検体の細菌検査結果

| No. | 種別     | 雄雌 | 肥養県 | O157* |    | カンピロバクター** |    | 腸内細菌科菌群***<br>(CFU/g) |
|-----|--------|----|-----|-------|----|------------|----|-----------------------|
|     |        |    |     | 定量    | 定性 | 定量         | 定性 |                       |
| 1   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 2.2E+07               |
| 2   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 3.2E+06               |
| 3   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 1.9E+05               |
| 4   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 2.3E+05               |
| 5   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 1.7E+06               |
| 6   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 6.1E+06               |
| 7   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 4.3E+04               |
| 8   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 5.0E+03               |
| 9   | ホルスタイン | メス | B県  | －     | －  | －          | －  | 3.7E+05               |

\*: O157 定量はふき取り液0.1ml当り(ふき取り面積0.25cm<sup>2</sup>)

\*: O157 定性はふき取り液1.0ml当り(ふき取り面積2.5cm<sup>2</sup>)

\*\*: カンピロバクター 定量はふき取り液0.1ml当り(ふき取り面積0.25cm<sup>2</sup>)

\*\*: カンピロバクター 定性はふき取り液1.0ml当り(ふき取り面積2.5cm<sup>2</sup>)

\*\*\*: 腸内細菌科菌群は25cm<sup>2</sup>当り

|     |         |
|-----|---------|
| 平均  | 3.7E+06 |
| 最大値 | 2.2E+07 |
| 最小値 | 5.0E+03 |
| 中央値 | 3.7E+05 |

#### ※ 8 : と畜場 B での直腸内容物の汚染状況

肉用牛 20 頭における直腸内容物の汚染状況を表 1－8 に示した。平成 24 年度調査(※ 7)では、指標菌として腸内細菌科菌群のみを対象としたが、本調査では大腸菌群、大腸菌も検査対象に含めることとした。O157 は 1 検体で陽性(MPN ; <30/100g)であった。カンピロバクターは 14 検体で陽性(10<sup>2</sup>～10<sup>6</sup>cfu/g)で、6 検体は陰性(<100/g)であった。腸内細菌科菌群は 20 頭の平均が 5.7×10<sup>7</sup>cfu/g であり、最小値 1.1×10<sup>5</sup>cfu/25cm<sup>2</sup>から最大値 2.3×10<sup>8</sup>cfu/25cm<sup>2</sup>と、平成 24 年度(※ 7)の体表の結果と同様に個体差が大きかった。このことは大腸菌群や大腸菌に関しても同様であった。腸内細菌科菌群や大腸菌群、大腸菌の濃度と、O157 やカンピロバクターの汚染濃度に明確な関連性は認められなかった。

表 1－8. と畜場での直腸内容物検体の細菌検査結果

| No.    | 腸内細菌科菌群<br>(CFU/g) | 大腸菌群<br>(CFU/g) | 大腸菌<br>(CFU/g) | O157<br>(定性:/25g、定量:MPN/100g) | カンピロバクター<br>(CFU/g) |
|--------|--------------------|-----------------|----------------|-------------------------------|---------------------|
| 1-8-1  | 2.0E+08            | 1.7E+08         | 1.1E+08        | -                             | 10 <sup>3</sup>     |
| 1-8-2  | 6.8E+06            | 8.5E+06         | 1.0E+05        | -                             | 10 <sup>5</sup>     |
| 1-8-3  | 2.9E+07            | 4.0E+07         | 4.0E+07        | -                             | 10 <sup>4</sup>     |
| 1-8-4  | 1.8E+05            | 2.1E+05         | 2.0E+05        | -                             | <100                |
| 1-8-5  | 4.3E+06            | 9.4E+06         | 6.7E+06        | -                             | <100                |
| 1-8-6  | 2.6E+06            | 3.4E+06         | 1.4E+06        | -                             | 10 <sup>5</sup>     |
| 1-8-7  | 1.6E+08            | 3.4E+08         | 3.4E+08        | -                             | <100                |
| 1-8-8  | 4.0E+06            | 5.4E+06         | 1.1E+06        | -                             | 10 <sup>2</sup>     |
| 1-8-9  | 1.1E+05            | 1.2E+05         | 9.7E+04        | -                             | <100                |
| 1-8-10 | 3.2E+07            | 3.7E+07         | 3.1E+07        | -                             | <100                |
| 1-8-11 | 1.3E+07            | 1.1E+07         | 1.0E+07        | -                             | 10 <sup>3</sup>     |
| 1-8-12 | 1.2E+06            | 7.0E+05         | 2.0E+05        | -                             | 10 <sup>3</sup>     |
| 1-8-13 | 2.3E+08            | 2.0E+08         | 1.6E+08        | -                             | 10 <sup>6</sup>     |
| 1-8-14 | 7.0E+07            | 9.0E+07         | 9.0E+07        | -                             | 10 <sup>2</sup>     |
| 1-8-15 | 1.8E+08            | 3.0E+08         | 3.0E+08        | -                             | <100                |
| 1-8-16 | 4.7E+06            | 5.3E+06         | 4.8E+06        | -                             | 10 <sup>3</sup>     |
| 1-8-17 | 6.0E+05            | 1.3E+06         | 7.0E+05        | -                             | 10 <sup>2</sup>     |
| 1-8-18 | 4.0E+07            | 3.9E+07         | 3.8E+07        | -                             | 10 <sup>3</sup>     |
| 1-8-19 | 1.6E+05            | 1.8E+05         | 1.3E+05        | -                             | 10 <sup>2</sup>     |
| 1-8-20 | 1.6E+08            | 1.5E+08         | 1.5E+08        | +( <30)                       | <100                |
| 平均     | 5.7E+07            | 7.1E+07         | 6.4E+07        |                               |                     |
| 最大値    | 2.3E+08            | 3.4E+08         | 3.4E+08        |                               |                     |
| 最小値    | 1.1E+05            | 1.2E+05         | 9.7E+04        |                               |                     |
| 中央値    | 9.9E+06            | 1.0E+07         | 8.4E+06        |                               |                     |

※9：と畜場 C での直腸内容物と体表の汚染状況

肉用牛 29 頭における直腸内容物と体表の汚染状況を表 1－9 に示した。と畜場での調査（※7 及び※8）を踏まえ、と畜場 C において同一牛について直腸内容物と体表ふき取り調査を実施した。直腸内容物について見ると、O157 は 1 検体で陽性（MPN；<30/100g）、カンピロバクターは 18 検体で陽性であった。腸内細菌科菌群は平均  $7.1 \times 10^6$  cfu/g であり、最小値  $8.0 \times 10^2$  cfu/g から最大値  $1.4 \times 10^8$  cfu/g と、上述の調査結果（※8）と同様に個体差が大きかった。次に体表ふき取りについて見ると、O157 は検出されなかったが、カンピロバクターは 1 検体で陽性であった。腸内細菌科菌群は平均  $9.8 \times 10^3$  cfu/25cm<sup>2</sup> であり、最小値  $4.0 \times 10^1$  cfu/25cm<sup>2</sup> から最大値  $6.8 \times 10^4$  cfu/25cm<sup>2</sup> と、上述の調査結果（※7）と同様に個体差が大きかった。と畜場 B での調査結果（※8）と同様に、腸内細菌科菌群の濃度と、O157 やカンピロバクターの汚染濃度に明確な関連性は認められなかった。

表 1－9．と畜場での直腸内容物検体と体表ふき取り検体の細菌検査結果

| 番号     | 種別     | 雄雌 | 肥養県 | 直腸内容物 |    |            | 体表拭き取り     |    |            |
|--------|--------|----|-----|-------|----|------------|------------|----|------------|
|        |        |    |     | O157* |    | 腸内細菌科菌群*** | カンピロバクター** |    | 腸内細菌科菌群*** |
|        |        |    |     | 定量    | 定性 |            | 定量         | 定性 |            |
| 1-9-1  | 交雑種    | 牝  | C県  | -     | -  | -          | 2.1E+03    | -  | <100       |
| 1-9-2  | 交雑種    | 牝  | C県  | -     | -  | -          | 5.7E+05    | -  | 6.0E+02    |
| 1-9-3  | 交雑種    | 牝  | C県  | -     | -  | -          | 3.0E+06    | -  | <100       |
| 1-9-4  | 交雑種    | 牝  | C県  | -     | -  | -          | 2.2E+07    | -  | 1.1E+04    |
| 1-9-5  | 交雑種    | 牝  | C県  | -     | -  | -          | 6.0E+04    | -  | <100       |
| 1-9-6  | 交雑種    | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 2.1E+05    | -  | <100       |
| 1-9-7  | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 6.3E+05    | -  | 2.2E+03    |
| 1-9-8  | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 2.6E+06    | -  | 8.6E+03    |
| 1-9-9  | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 5.1E+04    | -  | 7.0E+01    |
| 1-9-10 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 1.0E+06    | -  | 1.2E+03    |
| 1-9-11 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 7.9E+03    | -  | 4.0E+02    |
| 1-9-12 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 8.3E+03    | -  | 2.0E+01    |
| 1-9-13 | 黒毛和種   | 去勢 | D県  | -     | -  | +          | 9.5E+05    | -  | 2.6E+03    |
| 1-9-14 | 黒毛和種   | 去勢 | D県  | -     | -  | +          | 3.4E+05    | -  | 2.5E+03    |
| 1-9-15 | 黒毛和種   | 去勢 | D県  | -     | -  | +          | 1.4E+08    | -  | 6.0E+01    |
| 1-9-16 | 黒毛和種   | 去勢 | D県  | -     | -  | -          | 2.2E+06    | -  | 2.0E+01    |
| 1-9-17 | 黒毛和種   | 去勢 | D県  | -     | -  | +          | 2.1E+07    | -  | 1.7E+04    |
| 1-9-18 | 黒毛和種   | 去勢 | D県  | -     | -  | -          | 1.7E+06    | -  | 1.0E+01    |
| 1-9-19 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 1.4E+04    | -  | 3.0E+01    |
| 1-9-20 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | -          | 1.2E+06    | -  | 5.0E+01    |
| 1-9-21 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 2.2E+05    | -  | 1.0E+01    |
| 1-9-22 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 3.3E+05    | -  | 3.0E+01    |
| 1-9-23 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 4.5E+06    | -  | 5.2E+02    |
| 1-9-24 | 交雑種    | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 2.7E+05    | -  | 5.0E+01    |
| 1-9-25 | 交雑種    | 去勢 | C県  | -     | -  | -          | 1.7E+06    | -  | 2.5E+03    |
| 1-9-26 | 交雑種    | 去勢 | C県  | -     | -  | -          | 4.9E+04    | -  | 3.0E+01    |
| 1-9-27 | 交雑種    | 去勢 | C県  | -     | -  | -          | 8.0E+02    | -  | <10        |
| 1-9-28 | 交雑種    | 去勢 | C県  | -     | -  | +          | 2.9E+05    | -  | 9.1E+03    |
| 1-9-29 | ホルスタイン | 去勢 | C県  | <30   | +  | +          | 1.0E+06    | -  | 1.2E+02    |

\*:O157 定性試験 + or -/2.5cm<sup>2</sup>

\*\* :カンピロバクター + or -/2.5cm<sup>2</sup>

\*\*\*:腸内細菌科菌群 cfu/25cm<sup>2</sup>

#### ※ 10 : G 農場及びと畜場 A での同一牛の直腸内容物・体表・枝肉の汚染状況

肉用牛 4 頭を対象に、農場とと畜場において、同一牛の直腸内容物と体表、枝肉の汚染状況を調査し、その結果を表 1－10、表 1－11 に示した。なお、平均値等の算出にあたって、ふき取り検体の <1000cfu/cm<sup>2</sup> は 500cfu/25cm<sup>2</sup> として扱った。O157 は、農場、と畜場に関わらず全ての検体で検出されなかった。カンピロバクターは、農場及びと畜場で採取した直腸内容物からのみ検出され、体表や枝肉のふき取り検体からは検出されず、これまでの結果とほぼ同様であった。

農場及びと畜場で採取した直腸内容物の結果を見ると、腸内細菌科菌群は平均  $6.8 \times 10^6$ cfu/g 及び  $2.1 \times 10^8$ cfu/g であり、と畜場での菌数が高かった。これは個体番号 1-10-6 の個体が、と畜場で採取した時の直腸内容物の菌数が他と比較して高く、調査頭数も少なかったことが影響していると考えられ、個別の結果を見る限りにおいては、ほぼ同様であったと思われる。実際、個体番号 1-10-6 の個体のみ、と畜場で採取した直腸内容物の菌数が、農場時と比較して 1 オーダー以上高かった。次に、体表ふき取りの結果を見ると、農場採取の検体では 1 検体が  $2.0 \times 10^3$ cfu/25cm<sup>2</sup> であったものの、これ以外は検出限界以下 (<1000cfu/25cm<sup>2</sup>) である一方、と畜場では平均  $9.6 \times 10^3$ cfu/25cm<sup>2</sup> と農場採取時よりもやや高くなった。これについては、農場での採取時からと畜場までの間に部分的に汚染を受け

た等が考えられる。枝肉の汚染状況を見ると、2検体が検出限界以下(<1000cfu/25cm<sup>2</sup>)であったが、残りの2検体では $2.0\text{-}3.0\times 10^3\text{cfu/25cm}^2$ で検出された。

今回の調査では、農場、と畜場での採取スケジュールの都合上、4頭しか調査できなかったが、平成24から26年度の調査結果(※7、9及び10)からO157が体表や枝肉からは直接検出できず、枝肉からは腸内細菌科菌群や大腸菌が検出された状況を考慮すると、腸管内容物あるいは体表の腸内細菌科菌群あるいは大腸菌汚染を指標として、枝肉の汚染状況をモニタリングできる可能性が示唆された。

表 1－1 0 農場での細菌検査結果 -直腸内容物

| 個体番号   | 種別  | 雄雌 | 肥養県 | O157* |    | カンピロバクター** | 腸内細菌科菌群*** | 大腸菌群    | 大腸菌     |
|--------|-----|----|-----|-------|----|------------|------------|---------|---------|
|        |     |    |     | 定量    | 定性 |            |            |         |         |
| 1-10-1 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | +          | 1.6E+06    | 1.1E+06 | 1.1E+06 |
| 1-10-2 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | 2.5E+05    | 2.1E+05 | 2.1E+05 |
| 1-10-3 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | +          | 8.3E+05    | 6.7E+05 | 6.7E+05 |
| 1-10-4 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | +          | 2.7E+06    | 5.2E+06 | 5.2E+06 |
| 1-10-5 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | +          | 5.9E+05    | 6.8E+05 | 6.8E+05 |
| 1-10-6 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | +          | 3.5E+07    | 4.5E+07 | 4.5E+07 |
|        |     |    |     | 平均    |    |            | 6.8E+06    | 8.8E+06 | 8.8E+06 |
|        |     |    |     | 最大値   |    |            | 3.5E+07    | 4.5E+07 | 4.5E+07 |
|        |     |    |     | 最小値   |    |            | 2.5E+05    | 2.1E+05 | 2.1E+05 |
|        |     |    |     | 中央値   |    |            | 1.2E+06    | 8.9E+05 | 8.9E+05 |

農場での細菌検査結果 -体表ふき取り-

| 個体番号   | 種別  | 雄雌 | 肥養県 | O157* |    | カンピロバクター** | 腸内細菌科菌群*** | 大腸菌群    | 大腸菌     |
|--------|-----|----|-----|-------|----|------------|------------|---------|---------|
|        |     |    |     | 定量    | 定性 |            |            |         |         |
| 1-10-1 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | <1000      | 1.0E+03 | 1.0E+03 |
| 1-10-2 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | <1000      | <1000   | <1000   |
| 1-10-3 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | <1000      | <1000   | <1000   |
| 1-10-4 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | 2.0E+03    | 1.0E+03 | <1000   |
| 1-10-5 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | <1000      | 1.0E+03 | <1000   |
| 1-10-6 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  | -          | <1000      | 1.0E+03 | <1000   |
|        |     |    |     | 平均    |    |            | 7.5E+02    | 8.3E+02 | 5.8E+02 |
|        |     |    |     | 最大値   |    |            | 2.0E+03    | 1.0E+03 | 1.0E+03 |
|        |     |    |     | 最小値   |    |            | 5.0E+02    | 5.0E+02 | 5.0E+02 |
|        |     |    |     | 中央値   |    |            | 5.0E+02    | 1.0E+03 | 5.0E+02 |

直腸内容物検体

\*:O157 定性試験 +or-/25g

\*\* :カンピロバクター +or-/g

\*\*\*:腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌 cfu/g

ふき取り検体

\*:O157 定性試験 +or-/25cm<sup>2</sup>

\*\* :カンピロバクター +or-/2.5cm<sup>2</sup>

\*\*\*:腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌 cfu/25cm<sup>2</sup>

表 1-1-1 と畜場での細菌検査結果 -直腸内容物-

| 個体番号   | 種別  | 雄雌 | 肥養県 | O157* |    | カンピロバクター** |    | 腸内細菌科菌群*** | 大腸菌群    | 大腸菌     |
|--------|-----|----|-----|-------|----|------------|----|------------|---------|---------|
|        |     |    |     | 定量    | 定性 | 定量         | 定性 |            |         |         |
| 1-10-1 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | +  | 1.5E+06    | 1.9E+06 | 1.9E+06 |
| 1-10-2 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | +  | 1.5E+05    | 1.5E+05 | 1.5E+05 |
| 1-10-5 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | +  | 4.8E+05    | 7.3E+05 | 7.3E+05 |
| 1-10-6 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | +  | 8.2E+08    | 7.4E+08 | 7.4E+08 |
|        |     |    |     | 平均    |    |            |    | 2.1E+08    | 1.9E+08 | 1.9E+08 |
|        |     |    |     | 最大値   |    |            |    | 8.2E+08    | 7.4E+08 | 7.4E+08 |
|        |     |    |     | 最小値   |    |            |    | 1.5E+05    | 1.5E+05 | 1.5E+05 |
|        |     |    |     | 中央値   |    |            |    | 9.9E+05    | 1.3E+06 | 1.3E+06 |

と畜場での細菌検査結果 -体表ふき取り-

| 個体番号   | 種別  | 雄雌 | 肥養県 | O157* |    | カンピロバクター** |    | 腸内細菌科菌群*** | 大腸菌群    | 大腸菌     |
|--------|-----|----|-----|-------|----|------------|----|------------|---------|---------|
|        |     |    |     | 定量    | 定性 | 定量         | 定性 |            |         |         |
| 1-10-1 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | <1000      | 1.0E+03 | 1.0E+03 |
| 1-10-2 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | 3.0E+03    | <1000   | <1000   |
| 1-10-5 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | 1.3E+04    | 1.1E+04 | 9.0E+03 |
| 1-10-6 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | 2.2E+04    | 1.5E+04 | 1.5E+04 |
|        |     |    |     | 平均    |    |            |    | 9.6E+03    | 6.9E+03 | 6.4E+03 |
|        |     |    |     | 最大値   |    |            |    | 2.2E+04    | 1.5E+04 | 1.5E+04 |
|        |     |    |     | 最小値   |    |            |    | 5.0E+02    | 5.0E+02 | 5.0E+02 |
|        |     |    |     | 中央値   |    |            |    | 8.0E+03    | 6.0E+03 | 5.0E+03 |

と畜場での細菌検査結果-枝肉ふき取り-

| 個体番号   | 種別  | 雄雌 | 肥養県 | O157* |    | カンピロバクター** |    | 腸内細菌科菌群** | 大腸菌群    | 大腸菌     |
|--------|-----|----|-----|-------|----|------------|----|-----------|---------|---------|
|        |     |    |     | 定量    | 定性 | 定量         | 定性 |           |         |         |
| 1-10-1 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | <1000     | <1000   | <1000   |
| 1-10-2 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | <1000     | <1000   | <1000   |
| 1-10-5 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | 3.0E+03   | 5.0E+03 | 5.0E+03 |
| 1-10-6 | 交雑種 | 雌  | A県  | -     | -  |            | -  | 2.0E+03   | 4.0E+03 | 4.0E+03 |
|        |     |    |     | 平均    |    |            |    | 1.5E+03   | 2.5E+03 | 2.5E+03 |
|        |     |    |     | 最大値   |    |            |    | 3.0E+03   | 5.0E+03 | 5.0E+03 |
|        |     |    |     | 最小値   |    |            |    | 5.0E+02   | 5.0E+02 | 5.0E+02 |
|        |     |    |     | 中央値   |    |            |    | 1.3E+03   | 2.3E+03 | 2.3E+03 |

直腸内容物検体

\*: O157 定性試験 +or-/25g

\*\* : カンピロバクター +or-/g

\*\*\*: 腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌 cfu/g

ふき取り検体

\*: O157 定性試験 +or-/25cm<sup>2</sup>

\*\* : カンピロバクター +or-/2.5cm<sup>2</sup>

\*\*\*: 腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌 cfu/25cm<sup>2</sup>

## 2. 中課題2：分離菌株の解析による動態・汚染の伝播の解析【東京顕微鏡院】

### (1) 全体計画の概要

| 工程表                                                                                                            | 進捗状況・成果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2. 分離菌株の解析による動態・汚染の伝播の解析</p> <p>汚染実態調査で分離された腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの生化学的性状や遺伝子検査によって分離菌株の解析を実施し、疫学的な調査を実施する。</p> | <p>解析に用いた腸管出血性大腸菌 O157（以下 O157）及びカンピロバクターは、中課題 1, 3, 4 で分離された菌株を用いた。各検体から 1 株から 3 株分離を行い、O157 は 6 9 検体 1 4 9 株、カンピロバクターは 1 5 3 検体 3 2 5 株であった（表 2－1）。</p> <p>※ 1</p> <p>O157 は毒素遺伝子をはじめとした病原関連遺伝子の有無を PCR 法で確認（表 2－2）及び疫学解析はパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法及び IS-Printing 法を行った（図 2－1、図 2－2、表 2－3）。※ 2</p> <p>カンピロバクターは PCR 法を用いた同定（表 2－4）及び、疫学解析はフラジェリン遺伝子の RFLP 法による型別を行った（表 2－5）。（平成 2 4～2 6 年度）※ 3</p> <p>【追】</p> <p>3 頭の肉用牛から分離した O157、各 1 0 株（直接培養または最確数法での異なる陽性管）を分離し、PFGE 法により疫学解析を実施し、個体の中での多様性の有無を確認した（図 2－3）。（平成 2 6 年度）※ 4</p> <p>中課題 4 で肉用牛 2 頭から分離された大腸菌（1 週間ごとに 5 株、3 週間）を PFGE 法にて疫学解析を実施し、大腸菌汚染の多様性の有無を確認した（図 2－4）。（平成 2 6 年度）※ 5</p> |

|                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                             | <p style="text-align: center;">↓</p> <p>疫学解析の結果、O157 は大部分の農場で単一の遺伝子型を有する菌株のみが分離されていた。また、単一の肉用牛では、単一の遺伝子型を有する菌株に感染していることが認められた。一方、大腸菌は複数の株が入れ替わり、存在していることが確認され、O157 の感染状況と一般的な大腸菌の感染状況が異なることが確認できた。</p> <p>カンピロバクターは各農場内で複数の遺伝子型の菌株に汚染していることが認められた。また、この遺伝子型が複数の農場にまたがって汚染が確認されたが、汚染・伝播を明確にすることができなかった。</p> <p>中課題 4 において分離された O157 を解析した結果、同一遺伝子型による汚染が継続的、全体的に広がっていること、また、肉用牛が農場内で再感染している可能性が考えられた。また、農場環境調査で敷料から検出されていることから農場内での伝播に要因の一つとして敷料の関与が強く示唆された。また、G 農場で平成 24 年度と 26 年度で異なる遺伝子型の O157 の汚染が確認されたことから、汚染している O157 の入れ替わり現象が確認されたが、この際の感染ルートは明らかではなかった。</p> |
| <p>成果目標： 分離菌株の解析を行うことにより、農場と周辺環境や農場間での腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染の伝播等を明らかにする。</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

<成果の概要の補足>

※ 1：疫学解析に用いた分離菌株

中課題 1（農場での汚染実態調査、農場環境調査）、中課題 3（消石灰散布試験）、中課題 4（微生物制御物質（3 製品）給与試験、ラクトフェリン給与試験）において分離され

た O157 及びカンピロバクター菌株を用いて疫学解析を実施した。用いた菌株の由来を表 2－1 に示した。

表 2－1．疫学解析に用いた O157 及びカンピロバクター

| 調査・試験名            | O157 |     | カンピロバクター |     |
|-------------------|------|-----|----------|-----|
|                   | 検体数  | 菌株数 | 検体数      | 菌株数 |
| 中課題1(農場での汚染実態調査)  | 29   | 77  | 113      | 258 |
| 中課題1(農場環境調査)      | 8    | 14  | NT       | NT  |
| 中課題3(消石灰散布試験)     | 5    | 10  | 23       | 31  |
| 中課題4(3製品給与試験)     | 27   | 48  | 7        | 19  |
| 中課題4(ラクトフェリン給与試験) | NT   | NT  | 10       | 17  |
| 合計                | 69   | 149 | 153      | 325 |

NT：試験せず

## ※2：O157 分離菌株の疫学解析

O157 の毒素タイプは69株中62株 89.9%が VT2 保有株であった(表 2－2)。またすべての株で病原関連遺伝子 *eaeA*、*hlyA* 遺伝子を保有していた。

疫学解析の結果、得られた PFGE 型を a から i の 9 型に分類した。S 農場由来株と T 農場由来株は同一パターン、それ以外は農場ごとに異なるパターンであった。農場内では N 農場由来の 2 株(レーン 18 及び 19)が異なるパターンを示し、異なる 2 つの由来の株が認められた。また、B 農場ではレーン 3、8 でバンド 1 本の違い、G 農場ではレーン 11 でバンド 2 本の違いが認められ、同一由来株と考えられるが、変異が起こっている可能性が示唆された。それ以外の農場では、同一農場内で同一のパターンであり単一の由来の菌株であると予想された(図 2－1)。

一方、IS-Printing 法の結果では、PFGE 法で同一のパターンを示した S 農場由来株と T 農場由来株はセット 1 で異なるパターンを示した。また、T 農場内でも 2 つのパターンに分かれた。それ以外は PFGE 法と同様の結果が得られた(図 2－2)。

IS-Printing 法とは 1st セット及び 2nd セットともに 18 遺伝子を対象としたマルチプレックス PCR 法であり、各遺伝子の有無のパターンにより型別を行う方法である。本研究でこの IS-Printing 法の結果は、3 つの遺伝子を一つのグループとして、それぞれ 1 点、2 点、4 点に割り振り、増幅が認められた場合に加点を行うことにより、3 つの遺伝子の増幅のパターンを 0～7 の数値で表した。それを 1st、及び 2nd セットで各 6 グループ、12 ケタの数字でコード化し、型別を行った(表 2－3)。

PFGE 及び IS-Printing 法を用いた O157 の疫学解析では汚染実態調査で分離された 9 農場由来の 29 検体は 1 つの農場を除いた 8 農場では農場内で単一の遺伝子型の O157 に汚染されていることが明らかとなった。1 農場は 2 種類の遺伝子型となり、これらの菌株は毒素

タイプも異なっていた。また、PFGE と IS-Printing 法では同等の解析能を有していることが明らかとなった。

継続的に IS-Printing 法による疫学解析を実施した農場が 2 農場 (G 及び T 農場) あった。G 農場は汚染実態調査、農場環境調査、消石灰散布試験それぞれから分離されているが 3 回ともすべて異なるパターンであった (表 2-3)。一方、T 農場は汚染実態調査、3 製品給与試験及び農場環境調査で分離されていた。こちらも 3 パターン分離されているがそれぞれのパターンがハンド 1 本程度の違いであり、同一由来の O157 が一部の変異によって異なるパターンを示す可能性も考えられる (表 2-3)。しかし、G 農場のパターンは類似性が認められず、異なる由来と考えられる。T 農場は繁殖農場のため母牛は継続的に T 農場で飼育されているが、G 農場は肥育農場のため定期的に素牛の導入と出荷を繰り返しているため肉用牛の入れ替わりが起きている。それに合わせて O157 の菌株が入れ替わっていると考え、導入した素牛が汚染源となる可能性が予想される。

表 2-2. O157 の毒素型別結果

| 毒素型  | バリエント | 検体数 | 農場数 |
|------|-------|-----|-----|
| VT-  |       | 1   | 1   |
| VT2  | 2a    | 49  | 5   |
|      | 2c    | 8   | 2   |
|      | 2a2c  | 5   | 1   |
| VT12 | 1a2a  | 6   | 2   |

表 2-3. PFGE 及び IS-Printing 法による O157 解析結果

| 農家番号 | 採材日          | PFGE型 | ISコード  |        | 検体数 | 由来  | 調査・試験名           |
|------|--------------|-------|--------|--------|-----|-----|------------------|
|      |              |       | 1st    | 2nd    |     |     |                  |
| A農場  | H24.9.5      | a     | 105047 | 303440 | 1   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| B農場  | H24.9.10     | b     | 012057 | 214442 | 10  | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| G農場  | H24.9.6      | c     | 717577 | 611657 | 5   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| G農場  | H25.2.19     | NT    | 155057 | 303443 | 1   | 土壌  | 中課題1(農場環境調査)     |
| G農場  | H27.1.26-2.2 | NT    | 141047 | 300443 | 5   | 敷料  | 中課題3(消石灰散布試験)    |
| H農場  | H24.9.8      | d     | 155045 | 303442 | 2   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| M農場  | H26.7.22     | NT    | 305457 | 201642 | 2   | 直腸便 | 中課題1(農場環境調査)     |
| M農場  | H26.7.22     | NT    | 305457 | 201642 | 1   | 敷料  | 中課題1(農場環境調査)     |
| M農場  | H26.7.22     | NT    | 305457 | 201642 | 1   | ハエ  | 中課題1(農場環境調査)     |
| M農場  | H26.7.22     | NT    | 205457 | 201642 | 1   | ハエ  | 中課題1(農場環境調査)     |
| N農場  | H24.9.1      | e     | 115057 | 303443 | 1   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| N農場  | H24.9.1      | f     | 345457 | 311652 | 1   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| P農場  | H24.9.4      | g     | 145047 | 301443 | 1   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| R農場  | H24.9.1      | h     | 115047 | 343447 | 1   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| S農場  | H24.9.4      | i     | 114047 | 303443 | 3   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| T農場  | H24.9.17     | i     | 115057 | 703443 | 2   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| T農場  | H24.9.17     | i     | 115057 | 303443 | 2   | 直腸便 | 中課題1(農場での汚染実態調査) |
| T農場  | H25.5.20-9.2 | NT    | 115057 | 303443 | 27  | 直腸便 | 中課題4(3製品給与試験)    |
| T農場  | H25.2.19     | NT    | 115057 | 303442 | 1   | 敷料  | 中課題1(農場環境調査)     |
| T農場  | H25.7.8      | NT    | 105057 | 303443 | 1   | ハエ  | 中課題1(農場環境調査)     |

NT：試験せず

IS コード：IS-Printing 法（1st セット及び 2nd セットともに 18 遺伝子を対象としたマルチプレックス PCR 法）で、3 つの遺伝子を一つのグループとして、それぞれ 1 点、2 点、4 点に割り振り、増幅が認められた場合に加点を行うことにより、3 つの遺伝子の増幅のパターンを 0～7 の数値で表し、それを 1st 及び 2nd セットで各 6 グループ、12 桁の数字でコード化したもの。

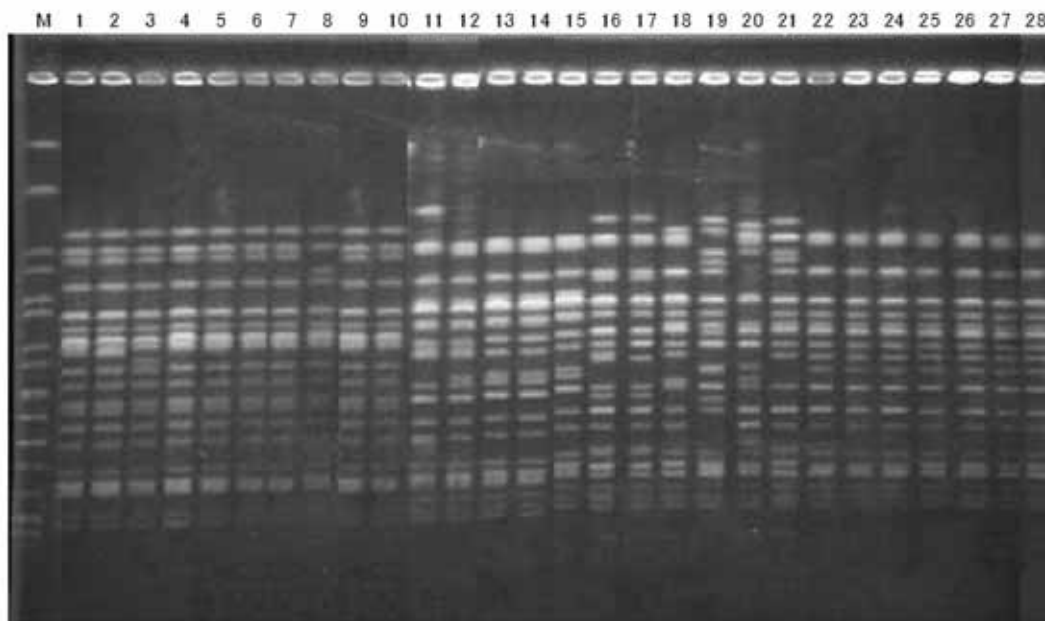
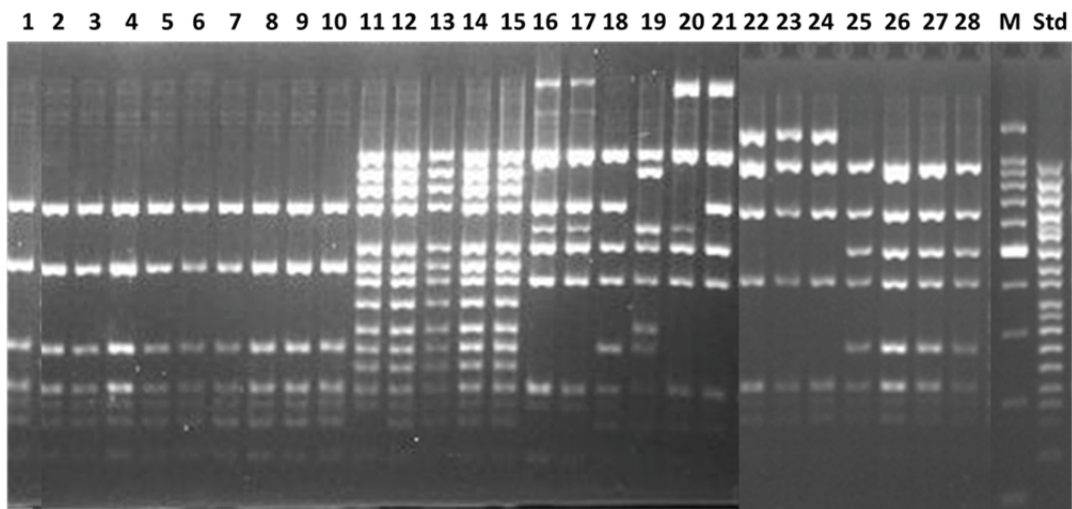


図 2－1．O157 分離菌株（汚染実態調査）の PFGE 解析結果（XbaI）

M：DNA サイズマーカー、レーン 1－10：B 農場より分離された 10 検体、レーン 11－15：G 農場より分離された 5 検体、レーン 16－17：H 農場より分離された 2 検体、レーン 18－19：N 農場より分離された 2 検体、レーン 20：P 農場より分離された 1 検体、レーン 21：R 農場より分離された 1 検体、レーン 22－24：S 農場より分離された 3 検体、レーン 25－28：T 農場より分離された 4 検体

(A)



(B)

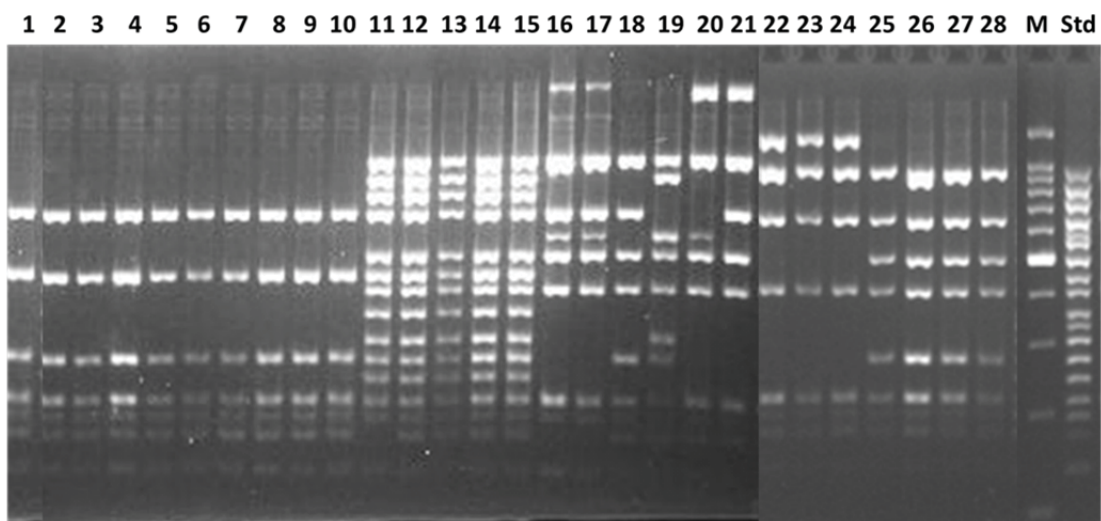


図 2-2. O157 分離菌株（汚染実態調査）の IS-Printing 法による解析

(A) IS-Printing 法 1st セット、M : DNA サイズマーカー (100bp ラダー)、Std : IS-Printing 法スタンダード、レーン 1-10 : B 農場より分離された 10 検体、レーン 11-15 : G 農場より分離された 5 検体、レーン 16-17 : H 農場より分離された 2 検体、レーン 18-19 : N 農場より分離された 2 検体、レーン 20 : P 農場より分離された 1 検体、レーン 21 : R 農場より分離された 1 検体、レーン 22-24 : S 農場より分離された 3 検体、レーン 25-28 : T 農場より分離された 4 検体

(B) IS-Printing 法 2nd セット、M : DNA サイズマーカー (100bp ラダー)、Std : IS-Printing 法スタンダード、レーン 1-10 : B 農場より分離された 10 検体、レーン 11-15 : G 農場より分離された 5 検体、レーン 16-17 : H 農場より分離された 2 検体、レーン 18-19 : N 農場より分離された 2 検体、レーン 20 : P 農場より分離された 1 検体、レーン 21 : R 農場より分離された 1 検体、レーン 22-24 : S 農場より分離された 3 検体、レーン 25-28 : T 農場より分離された 4 検体

り分離された1検体、レーン22-24：S農場より分離された3検体、レーン25-28：T農場より分離された4検体

### ※3カンピロバクター分離菌株の疫学解析

カンピロバクターのPCR法による同定検査の結果、153検体中131検体(85.6%)が*Campylobacter jejuni*、12検体(7.8%)が*C.coli*、2検体(1.3%)が*C.jejuni*及び*coli*が両方検出、3検体(2.0%)が*C.fetus*、そして5検体(3.3%)が同定できなかった(表2-4)。

カンピロバクターはフラジェリン遺伝子のRFLP法による型別で18タイプ(番号は19までだが11番が欠番)に分けることができた(表2-5)。また、1つの農場内で複数のタイプが確認された。1タイプが4農場、2タイプが3農場、3タイプが7農場、4タイプが6農場、5タイプ以上が3農場であった。また、複数の農場にまたがって存在するタイプのカンピロバクターが認められ、多いものでは11農場及び12農場から確認されたタイプもあった。

また、G農場は汚染実態調査と消石灰散布試験、T農場は3製品給与試験とラクトフェリン給与試験でそれぞれカンピロバクターが検出されており、その2回を比較するとG農場ではタイプ9は共通であったが他は異なるタイプ、T農場はタイプ1と9は共通であったが他は異なるタイプであった。

以上の結果よりカンピロバクターの汚染は多くのタイプの菌が多く、多くの農場から確認されており、農場への導入段階で素牛がすでにカンピロバクターに感染していた、又は、牛のカンピロバクターの感染経路が複数あった可能性が考えられた。このため、汚染源や感染経路に関しては解明するのは非常に困難であると思われる。

表2-4. カンピロバクターの同定結果

| 同定結果                            | 検体数 |
|---------------------------------|-----|
| <i>C.jejuni</i>                 | 131 |
| <i>C.coli</i>                   | 12  |
| <i>C.jejuni</i> と <i>C.coli</i> | 2   |
| <i>C.fetus</i>                  | 3   |
| UT                              | 5   |
| 合計                              | 153 |

UT：同定できず

表 2-5. カンピロバクター フラジェリン遺伝子型別結果

| 農場   | 採取日            | 検体数 | フラジェリンタイプ |    |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | タイプ数 |
|------|----------------|-----|-----------|----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
|      |                |     | 1         | 2  | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |      |
| A農場  | H24.9.5        | 5   | ○         | ○  |   |   |   |   |   | ○ | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 4    |
| C農場  | H24.8.20       | 7   |           | ○  | ○ | ○ |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 3    |
| D農場  | H24.8.31       | 1   |           |    |   |   | ○ |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1    |
| F農場  | H24.8.18       | 7   | ○         | ○  |   |   |   | ○ |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 3    |
| G農場  | H24.9.6        | 10  | ○         | ○  | ○ |   |   |   | ● | ○ | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 6    |
| G農場  | H27.1.19-2.2   | 23  |           |    |   | ○ | ○ |   |   |   | ○  |    |    | ○  |    |    |    |    | ○  | ○  | ○  | 7    |
| H農場  | H24.9.8        | 6   |           |    |   |   |   | ○ | ● | ○ |    | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 4    |
| I農場  | H24.9.8        | 1   |           |    |   |   |   |   |   |   |    | ●  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1    |
| J農場  | H24.9.3        | 5   |           |    |   |   | ○ | ○ |   | ○ | ○  |    |    |    | ○  |    |    |    |    |    |    | 5    |
| K農場  | H24.9.26       | 6   |           |    |   |   |   |   |   |   | ○  |    |    | ○  |    |    |    |    |    |    |    | 2    |
| L農場  | H24.10.1       | 2   |           |    |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    | ○  |    |    |    |    |    |    | 1    |
| M農場  | H24.8.28       | 5   |           | ○  |   |   | ○ | ○ |   |   | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 4    |
| N農場  | H24.9.1        | 4   |           |    |   |   |   |   |   | ○ |    |    |    |    | ○  |    |    |    |    |    |    | 2    |
| O農場  | H24.8.26       | 4   | ○         |    |   |   | ○ |   |   |   |    |    |    |    |    | ○  |    |    |    |    |    | 3    |
| P農場  | H24.9.4        | 9   |           |    |   | ○ |   |   |   |   | ○  |    |    |    | ○  |    | ○  |    |    |    |    | 4    |
| Q農場  | H24.8.26       | 9   |           | ○  |   | ○ | ○ |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 3    |
| R農場  | H24.9.1        | 4   |           | ○  |   |   | ○ |   |   |   | ○  |    |    |    |    |    |    | ○  |    |    |    | 4    |
| T農場  | H25.6.24-10.28 | 9   | ○         | ○  |   |   |   |   |   |   | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 3    |
| T農場  | H26.11.3-11.24 | 8   | ○         |    |   |   |   |   |   |   | ○  | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 3    |
| a農場  | H25.10.7       | 9   |           | ○  |   | ○ |   |   |   |   | ○  | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 4    |
| b農場  | H25.10.31      | 7   | ○         |    |   |   |   | ○ |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | ○  |    |    | 3    |
| c農場  | H25.11.5       | 3   | ○         | ○  |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 2    |
| e農場  | H25.11.6       | 1   |           |    |   |   |   | ○ |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1    |
| f農場  | H25.12.9       | 6   |           | ○  | ○ |   | ○ | ○ |   |   | ○  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 5    |
| 農場合計 |                |     | 8         | 11 | 3 | 5 | 8 | 7 | 2 | 5 | 12 | 4  | 0  | 2  | 4  | 1  | 1  | 1  | 2  | 1  | 1  |      |

○ : *C.jejuni*

● : *C.coli*

#### ※4 : 肉用牛個体中の O157 の解析

3頭の肉用牛から分離した O157、各 10 株(直接培養または最確数法での異なる陽性管)を分離し、PFGE 法により疫学解析を実施し、個体の中での多様性の有無を確認した(図 2-3)。3頭の牛から分離された O157 は、それぞれ牛ごとに同一のパターンを示し、個体の中では単一由来の O157 に感染している可能性が高いことが示唆された。

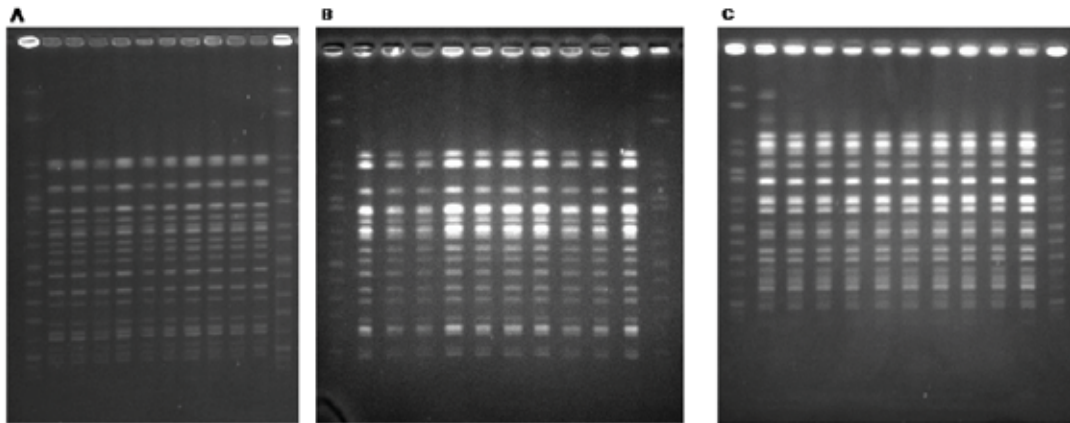


図2-3. 単一牛由来のO157のPFGE法による解析

A: 3製品給与試験 T農場 B-3(平成25年6月24日)、B: 汚染実態調査 a農場(平成25年10月7日)、C: 汚染実態調査 c農場(平成25年11月5日)

#### ※5: 肉用牛腸内の大腸菌の解析

中課題4のラクトフェリン給与試験において、肉用牛2頭から分離された大腸菌(1週間ごとに5株、3週間)をPFGE法にて疫学解析を実施し、大腸菌汚染の多様性の有無を確認した(図2-4)。

大腸菌は図4の(A)ではレーン1、3、11、12、13が同一タイプ、レーン7、8が同一タイプ、レーン4と5は類似タイプ、レーン6は7、8と類似タイプもしくは同一タイプとなり、8つのタイプに分けられた。(B)ではレーン2、3、5、11、14、15が同一タイプ、レーン6-10が同一タイプとなり、6つのタイプに分けられた(図4)。同一採取時期でも複数のタイプが認められ、別の採取時期にもまたがって同一タイプが確認されており、大腸菌は牛腸内では複数の由来の菌が存在しており、O157の感染の状態とは異なる結果となった。

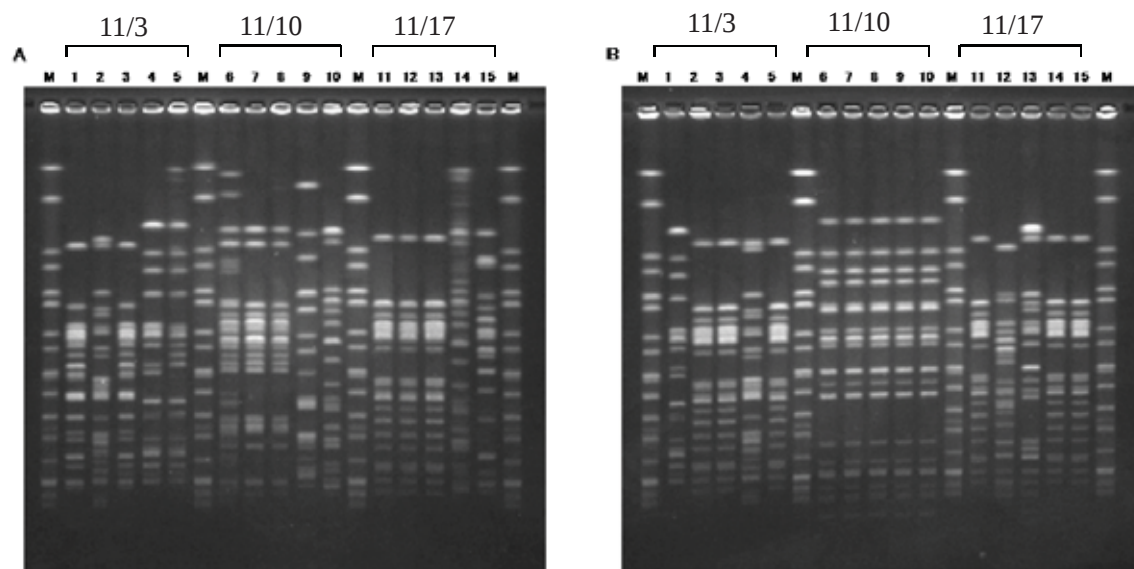


図 2-4. 継続的に分離した大腸菌の PFGE 法による解析

M : DNA サイズマーカー XbaI digested *Salmonella*、(A)ラクトフェリン給与試験 A-1、レーン 1-5 : 11 月 3 日採取、レーン 6-10 : 11 月 10 日採取、レーン 11-15 : 11 月 17 日採取、(B) C-1 から分離された大腸菌、レーン 1-5 : 11 月 3 日採取、レーン 6-10 : 11 月 10 日採取、レーン 11-15 : 11 月 17 日採取

### 3. 中課題3：新たな衛生対策の導入とその効果の検証【東京顕微鏡院】

#### (1) 全体計画の概要

| 工程表                                                                                                                                                                                                                                                           | 進捗状況・成果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>汚染実態調査や疫学解析の結果から腸管出血性大腸菌 O157 が牛舎の敷料から検出される事例が複数認められた。牛糞便中の O157 が敷料を汚染したことが考えられるが、この O157 に汚染された敷料が新たな汚染源となることが予想される。そのため、敷料を頻繁に交換することが最も有効であると考えられるが、生産者の労力とコストを考えると現実的では無いと思われる。そこで、農場で一般的な消毒で用いられている消石灰を敷料に散布することによる O157 及びカンピロバクターの低減効果について検討した。</p> | <p>市販の園芸土壌に腸管出血性大腸菌 O157（以下 O157）を添加して、消石灰を加えた試料を作成し、消石灰の殺菌効果を検証した。</p> <p>その結果、O157 の菌数の減少が認められ、消石灰の殺菌効果が確認された（表 3-1、3-2）。(平成 26 年度)</p> <p>※ 1</p> <p>G 農場において、牛房（4 m×8 m）に対して 20 kg、10 kg の消石灰散布及び消石灰を散布しない 3 つのグループを設け、消石灰試験スケジュール（表 3-3）に従い、敷料等の採取及び消石灰の散布を行った。</p> <p>採取した敷料及び落下糞便について、O157、カンピロバクター、大腸菌及び腸内細菌科菌群の検査を実施し、消石灰散布（1 週間に 1 度、計 2 回）による O157 及びカンピロバクターの低減効果を検討した。</p> <p>その結果、O157 及びカンピロバクターが検出されたが、消石灰の効果を明らかにすることができなかった（表 3-4、3-5）。(平成 26 年度)</p> <p>※ 2</p> |
| <p>成果目標： 腸管出血性大腸菌及びカンピロバクター汚染の低減化につながる衛生対策を提案し、その効果を検証する。</p>                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

#### <成果の概要の補足>

##### ※ 1：消石灰の殺菌効果の検証

市販の園芸土壌に O157 を添加して消石灰を加えた試料を作成し、殺菌効果の検証として、実験 1 及び実験 2 を実施した。

実験 1：市販の園芸用土壌 10 g を試料採取用滅菌袋(以下滅菌袋)に採取し、 $10^5$ CFU 程度の O157 を添加した試料を作成した。その滅菌袋に、消石灰（粉末状）1 g、2 g を加えた試料、及び消石灰を加えない対照試料（0 g）を準備し、25℃にて保存し、1 日後及び 6 日後（1 週間後を予定したが日程の関係で 6 日後となった。）に、生菌数（標準寒天）、大腸菌群数（酵素基質培地 ES コリマーク）及び O157（CT-SMAC）の菌数の算出を行った。各試料に 90 ml の滅菌希釈水を加え、よく攪拌した後に各寒天培地に試料液 0.1 ml を滴下し、塗抹培養を行った。37℃、24 時間培養後に集落数を計測して菌数を算出した（表 3－1）。O157 は 1 g、2 g とともに 1 日後で検出されず、消石灰の効果が明らかとなった。これは希釈水を加えることによって、試料液が強アルカリとなっており、土壌と消石灰が混合した状態での菌の影響が反映されていない可能性も考えられた。そこで、希釈液を加えずに直接培地に塗抹培養での試験を試みた（実験 2）。

表 3－1．消石灰による O157 消長試験 実験 1 結果

|       | 1 日後 (10 倍試料液) CFU/g |                   |                   | 6 日後 (10 倍希釈液) CFU/g |                   |                   |
|-------|----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
|       | 生菌数                  | 大腸菌群              | O157              | 生菌数                  | 大腸菌群              | O157              |
| 石灰 0g | $2.1 \times 10^6$    | $4.3 \times 10^4$ | $2.8 \times 10^4$ | $4.8 \times 10^5$    | $3.0 \times 10^2$ | $8.0 \times 10^2$ |
| 石灰 1g | $4.2 \times 10^4$    | ND                | ND                | $2.6 \times 10^5$    | ND                | ND                |
| 石灰 2g | $5.8 \times 10^4$    | ND                | ND                | $8.2 \times 10^4$    | ND                | ND                |

ND：検出せず

実験 2：市販の園芸用土壌 10 g を滅菌袋に採取し、 $10^5$ CFU 程度の O157 及び大腸菌を添加した試料を作成した。その滅菌袋に消石灰（粉末状）0.5 g、0.25 g を加えた試料及び消石灰を加えない対照試料（0 g）を準備し、25℃にて保存し、初発及び 2 日後に直接培養（集落数）、及び 2 日後に菌数の計測を行った。検査項目は生菌数（標準寒天）、大腸菌及び大腸菌群数（酵素基質培地 ES コリマーク）及び O157（CT-SMAC）であった。直接塗抹培養は各寒天培地に試料を約 1g はかり取り、塗抹培養を行った。37℃ 24 時間培養後に集落数を計測して菌数を算出した。菌数の計測は各試料に 90 ml の滅菌希釈水を加え、よく攪拌した後に各寒天培地に試料液 0.1 ml を滴下し、塗抹培養を行った。37℃ 24 時間培養後に集落数を計測して菌数を算出した（表 3－2）。O157 及び大腸菌は 2 日後でも完全に陰性とはならなかったが、消石灰なし試料と比べて菌数の減少傾向がみられ、消石灰の殺菌効果を確認できた。

表 3-2. 消石灰による O157 消長試験 実験 2 結果

|          |   | 初発(直接塗抹) 集落数 |      |      |      | 2日後(直接塗抹) 集落数 |      |      |      | 2日後(10倍試料液) CFU/g |                   |                   |                   |
|----------|---|--------------|------|------|------|---------------|------|------|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|          |   | 生菌数          | 大腸菌  | 大腸菌群 | O157 | 生菌数           | 大腸菌  | 大腸菌群 | O157 | 生菌数               | 大腸菌               | 大腸菌群              | O157              |
| 消石灰0g    | ① | TNTC         | TNTC | TNTC | 180  | TNTC          | 42   | 31   | 42   | $3.0 \times 10^6$ | $8.0 \times 10^3$ | $1.8 \times 10^4$ | $1.5 \times 10^4$ |
|          | ② | TNTC         | TNTC | TNTC | >200 | TNTC          | TNTC | TNTC | 90   | $3.5 \times 10^6$ | $6.0 \times 10^3$ | $1.1 \times 10^4$ | $1.2 \times 10^4$ |
| 消石灰0.25g | ① | TNTC         | 6    | 16   | 6    | TNTC          | 0    | 0    | 2    | $1.0 \times 10^6$ | $5.0 \times 10^2$ | $3.8 \times 10^3$ | $3.3 \times 10^3$ |
|          | ② | TNTC         | 30   | 60   | 30   | TNTC          | 0    | 0    | 0    | $4.8 \times 10^5$ | $4.0 \times 10^2$ | $2.8 \times 10^3$ | $2.2 \times 10^3$ |
| 消石灰0.5g  | ① | TNTC         | 70   | 73   | 6    | TNTC          | 16   | 46   | 7    | $5.2 \times 10^5$ | $1.3 \times 10^3$ | $4.9 \times 10^4$ | $4.4 \times 10^3$ |
|          | ② | TNTC         | 3    | 8    | 3    | TNTC          | 0    | 0    | 0    | $4.7 \times 10^5$ | 0                 | 0                 | $1.1 \times 10^2$ |

TNTC : too numerous to count

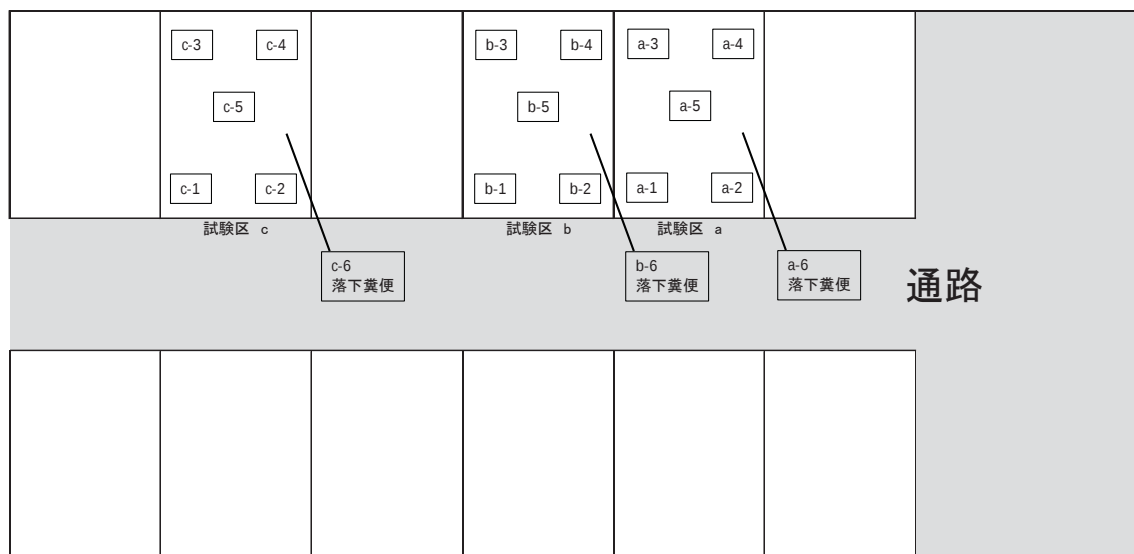
## ※ 2 : 消石灰散布試験

牛房 (4 m×8 m) に対して 20 kg/回、10 kg/回の消石灰散布及び消石灰を散布しない 3 つのグループ (グループ a～c) を設け、消石灰試験スケジュール (表 3-3) に従い、週 2 回 (月曜日及び水曜日)、計 8 回の敷料の採取及び週 1 回 (月曜日 : 2、3 週目)、計 2 回の消石灰の散布を行った。敷料については牛房の角から 30 cm 程度内部の表層付近を 4 か所 (a-1～4、b-1～4、c-1～4)、中央部の表層付近を 1 か所 (a-5、b-5、c-5) の 5 か所と、新鮮な落下糞便 (a-6、b-6、c-6) の計 6 検体を各グループから採取した (図 3-1)。

本試験では粒状消石灰を用いた。石灰散布を行うことによる肉用牛が興奮したり、怯えたりしている様子は確認されなかった。健康状態も変化は認められなかった。

表 3-3 消石灰散布試験スケジュール

| 日    | 月             | 火  | 水    | 木  | 金  | 土  |
|------|---------------|----|------|----|----|----|
| 1/11 | 12            | 13 | 14   | 15 | 16 | 17 |
|      | 試料採取          |    | 試料採取 |    |    |    |
| 18   | 19            | 20 | 21   | 22 | 23 | 24 |
|      | 試料採取<br>消石灰散布 |    | 試料採取 |    |    |    |
| 25   | 26            | 27 | 28   | 29 | 30 | 31 |
|      | 試料採取<br>消石灰散布 |    | 試料採取 |    |    |    |
| 2/1  | 2             | 3  | 4    | 5  | 6  | 7  |
|      | 試料採取          |    | 試料採取 |    |    |    |



試験区 a : 20 kg/回の消石灰散布、試験区 b : 10 kg/回の消石灰散布、試験区 c : 消石灰散布なし

図 3 - 1 . 試料採取農場概略図面と採取箇所

O157 は 1 回目 (1/12) 及び 2 回目 (1/19) はすべて陰性であったが、3 回目 (1/26) はグループ a の 2 検体、グループ c の 2 検体、合計 4 検体が陽性となった。4 回目はグループ a の 1 検体で陽性となった。複数回で陽性となる検体は認められなかった。定量検査の結果、すべての検体で <30/100g であった (表 3 - 4)。

表 3 - 4 . 消石灰散布試験 O157 結果 (CFU/100 g)

|     | 1月12日 | 1月19日 | 1月26日 | 2月2日  |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| a-1 | -     | -     | -     | + <30 |
| a-2 | -     | -     | -     | -     |
| a-3 | -     | -     | + <30 | -     |
| a-4 | -     | -     | + <30 | -     |
| a-5 | -     | -     | -     | -     |
| a-6 | -     | -     | -     | -     |
| b-1 | -     | -     | -     | -     |
| b-2 | -     | -     | -     | -     |
| b-3 | -     | -     | -     | -     |
| b-4 | -     | -     | -     | -     |
| b-5 | -     | -     | -     | -     |
| b-6 | -     | -     | -     | -     |
| c-1 | -     | -     | -     | -     |
| c-2 | -     | -     | -     | -     |
| c-3 | -     | -     | + <30 | -     |
| c-4 | -     | -     | + <30 | -     |
| c-5 | -     | -     | -     | -     |
| c-6 | -     | -     | -     | -     |

＋：検出

－：検出せず

カンピロバクターは1回目ですべて陰性であったが、2回目はグループ a の2検体の敷料と落下糞便、グループ b の1検体の敷料と落下糞便が陽性となった。3回目はグループ a の3検体の敷料と落下糞便、グループ b の2検体の敷料と落下糞便そしてグループ c の1検体の敷料と落下糞便が陽性となった。4回目はグループ a の3検体の敷料と落下糞便、グループ b の落下糞便そしてグループ c の3検体の敷料と落下糞便が陽性となった。3回陽性となったのはグループ a 及びグループ b の落下糞便、2回陽性は a-1、a-2、a-4、b-4、c-4 の敷料とグループ c の落下糞便であった。1回陽性は a-3、a-5、b-2、c-1、c-3 の敷料、すべて陰性は b-1、b-3、c-2、c-5 であった（表 3－5）。

表 3－5．消石灰散布試験 カンピロバクター結果

|     | 1月12日 | 1月19日 | 1月26日 | 2月2日 |
|-----|-------|-------|-------|------|
| a-1 | －     | ＋     | ＋     | －    |
| a-2 | －     | －     | ＋     | ＋    |
| a-3 | －     | －     | ＋     | －    |
| a-4 | －     | ＋     | －     | ＋    |
| a-5 | －     | －     | －     | ＋    |
| a-6 | －     | ＋     | ＋     | ＋    |
| b-1 | －     | －     | －     | －    |
| b-2 | －     | －     | ＋     | －    |
| b-3 | －     | －     | －     | －    |
| b-4 | －     | ＋     | ＋     | －    |
| b-5 | －     | －     | －     | －    |
| b-6 | －     | ＋     | ＋     | ＋    |
| c-1 | －     | －     | －     | ＋    |
| c-2 | －     | －     | －     | －    |
| c-3 | －     | －     | －     | ＋    |
| c-4 | －     | －     | ＋     | ＋    |
| c-5 | －     | －     | －     | －    |
| c-6 | －     | －     | ＋     | ＋    |

＋：検出

－：検出せず

以上の結果、敷料等から O157 及びカンピロバクターが検出されたが、消石灰散布による低減効果を明らかにすることができなかった。

大腸菌及び腸内細菌科菌群の菌数の推移は図 3－2～3－7 に示した。概ね、敷料が  $10^2 \sim 10^5$  CFU/g 落下糞便は  $10^4 \sim 10^6$  CFU/g で推移していた。

グループ別に採取時期ごとの菌数に際して t 検定による有意差検定を行った結果、石灰散布前後の菌量の有意な減少 ( $p < 0.05$ ) は、グループ a では大腸菌（図 3－8）、腸内細菌科菌群（図 3－9）ともに認められず、グループ b では大腸菌で 1 月 21 日と 2 月 2 日（図

3-10)、腸内細菌科菌群では1月26日と2月2日認められた(図3-11)。グループcでは認められなかった(図3-12, 3-13)。

大腸菌及び腸内細菌科菌群については、菌数が減少し有意差も確認できる部分も認められたが、消石灰散布による大腸菌及び腸内細菌科菌群の減少を確認できなかった。

本試験において、消石灰散布による敷料中の腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターの汚染低減効果を明らかにできなかったが、本調査で使用した消石灰が粒状であったため、粉末の消石灰よりも敷料等への浸透能が低く、効果が出るのに時間が必要であった可能性もある。今回は調査期間も短かったため殺菌効果を示すに至らなかったことから、散布する石灰の形状、散布量、散布期間、散布頻度等を考慮して検討を進める必要があると考えられた。また、消石灰によるO157消長試験では希釈液と混合した時点で強アルカリにより菌の減少があったと考えられる結果も出ているため、散布する石灰の状態（粉末、液体、泡状）等による効果の差についての検討も必要であるとする。

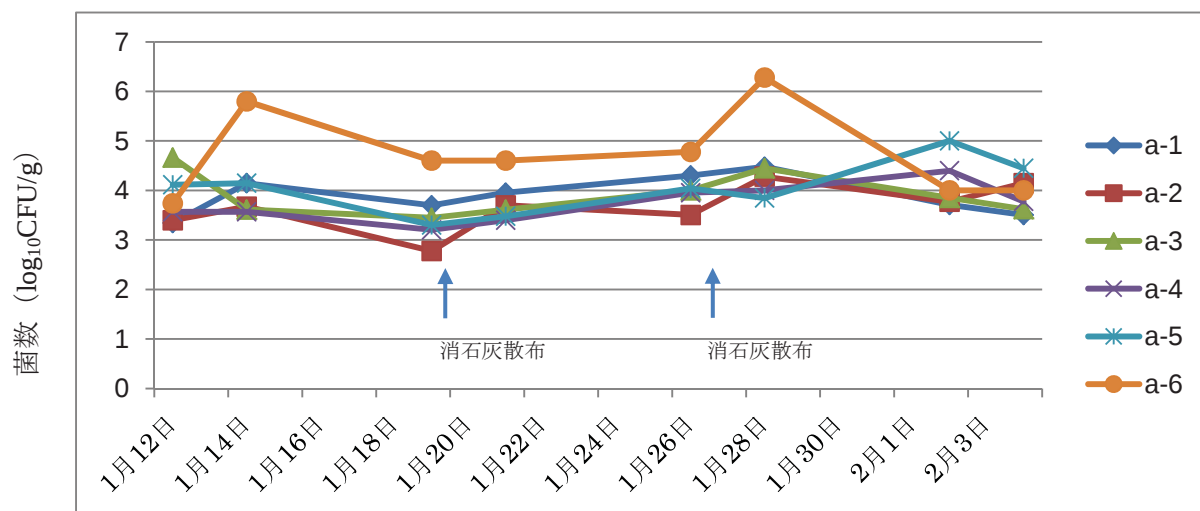


図3-2. グループa (牛房に20 kg/回の消石灰散布) 大腸菌 菌数推移

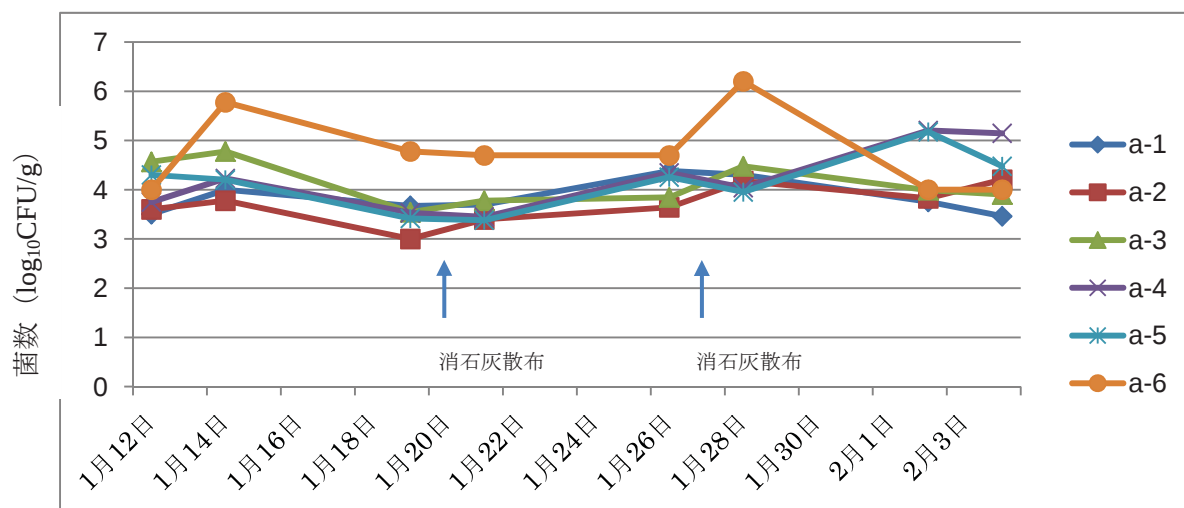


図3-3. グループa (牛房に20 kg/回の消石灰散布) 腸内細菌科菌群 菌数推移

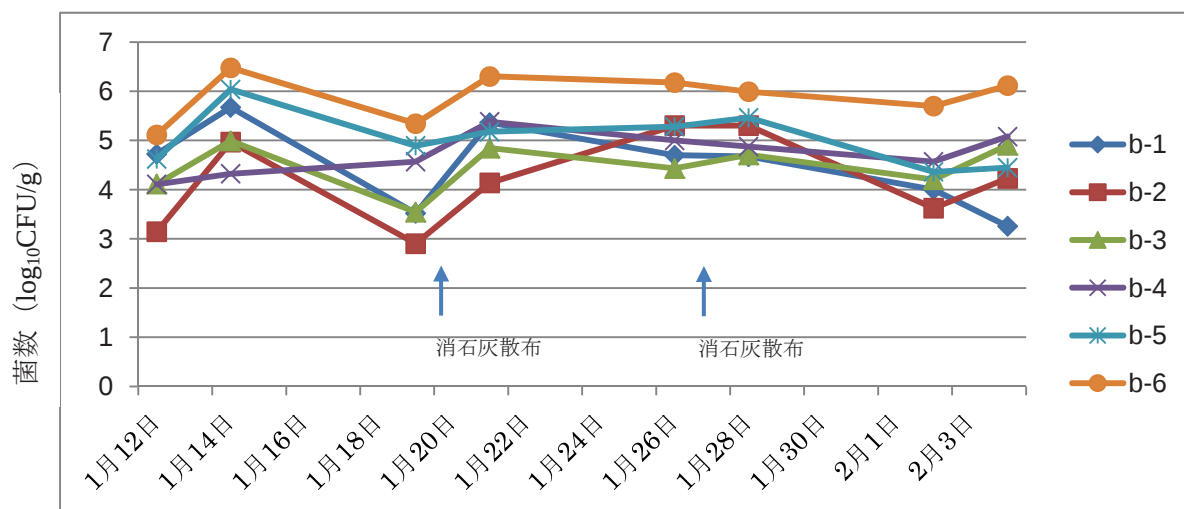


図3-4. グループb (牛房に10 kg/回の消石灰散布) 大腸菌 菌数推移

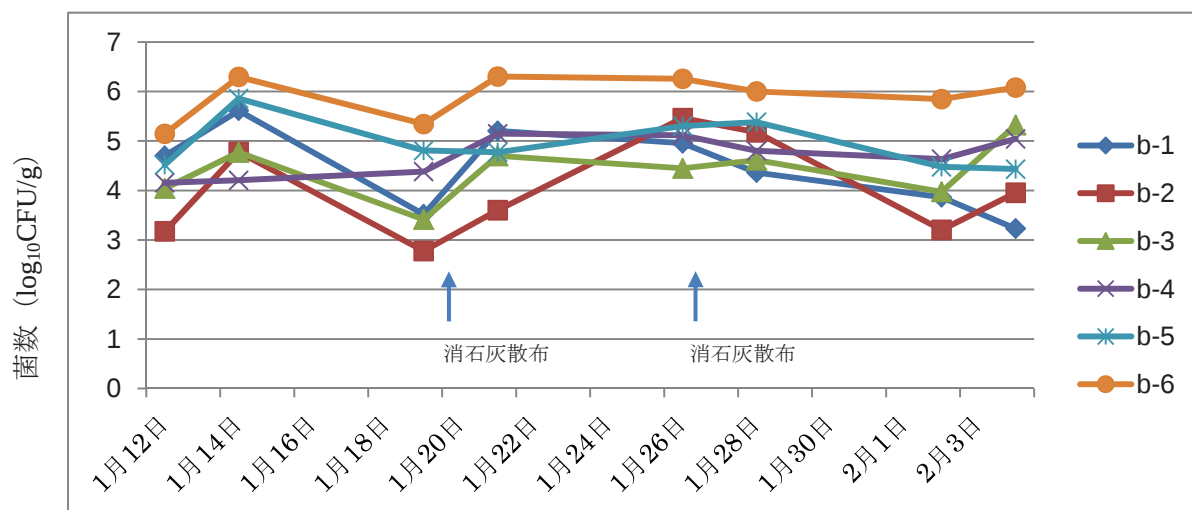


図3-5. グループb (牛房に10 kg/回の消石灰散布) 腸内細菌科菌群 菌数推移

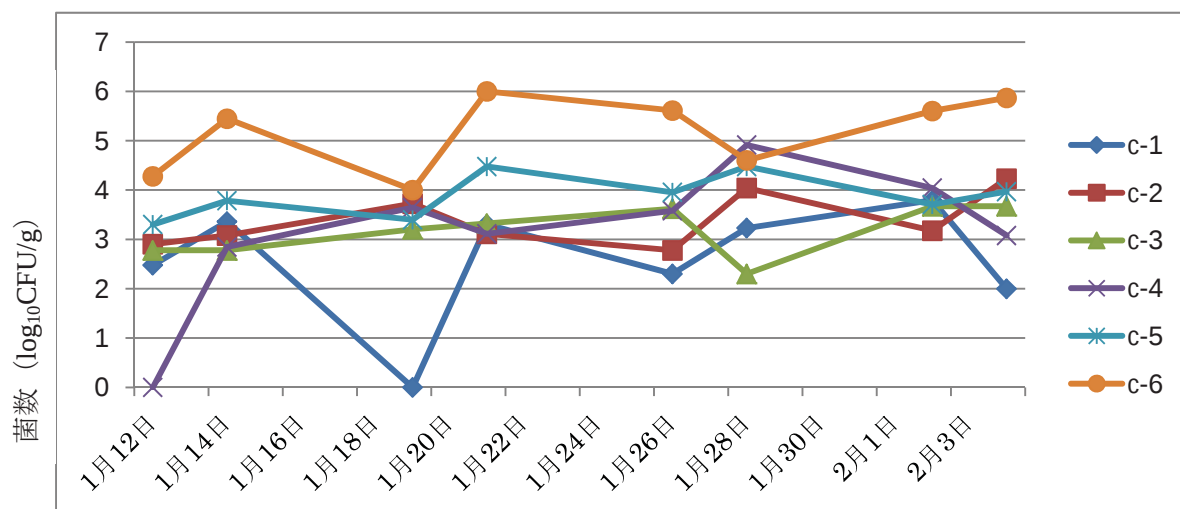


図3-6. グループc (牛房に消石灰散布なし) 大腸菌 菌数推移

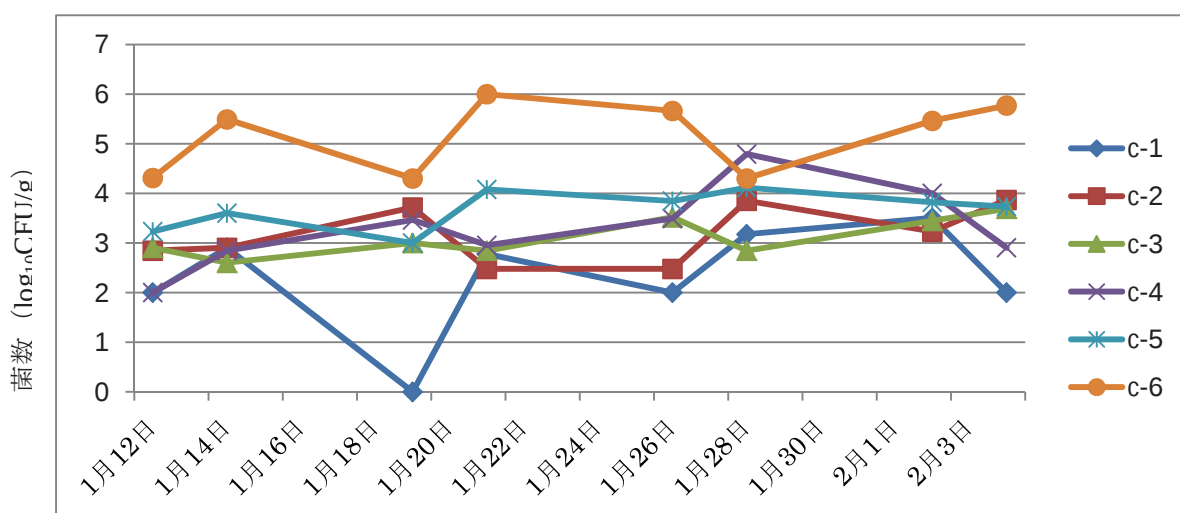


図3-7. グループc (牛房に消石灰散布なし) 腸内細菌科菌群 菌数推移

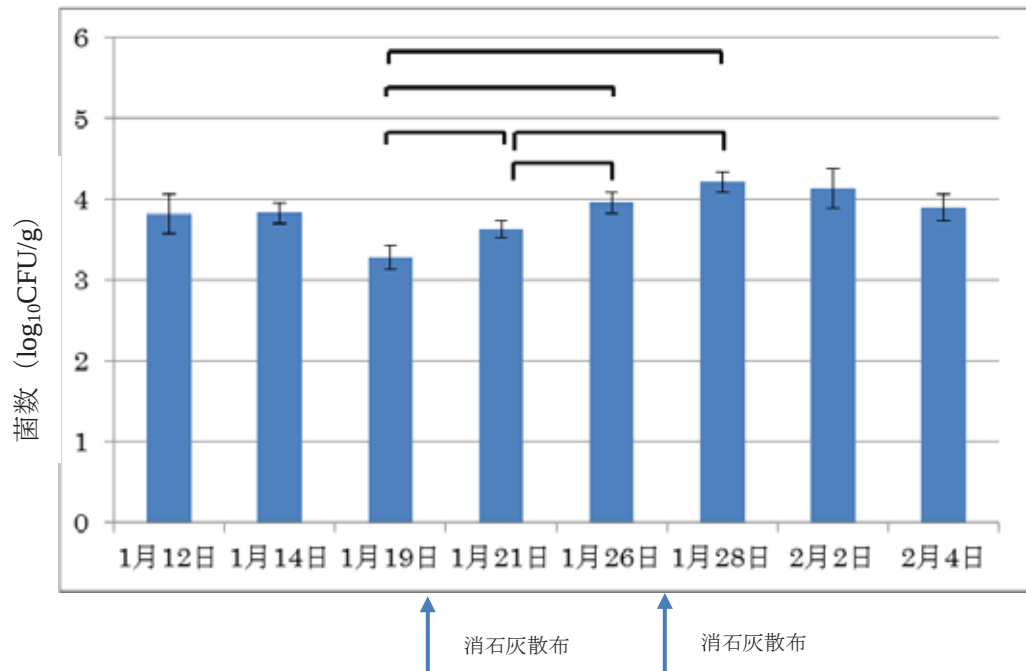


図3-8. グループa (牛房に20 kg/回の消石灰散布) 大腸菌 有意差解析

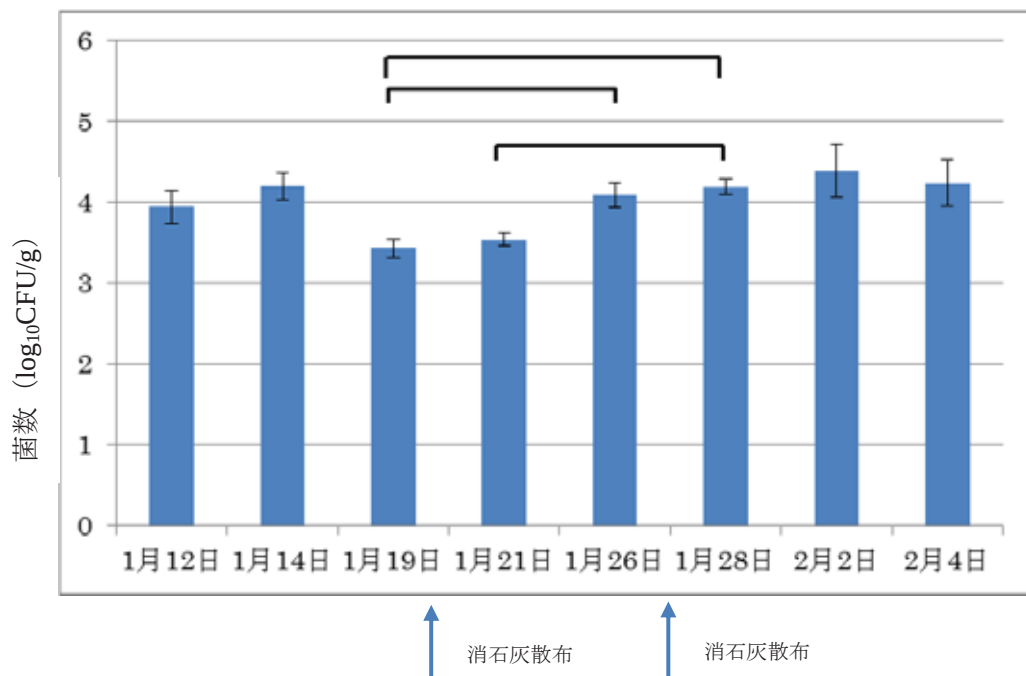


図3-9. グループa (牛房に20 kg/回の消石灰散布) 腸内細菌科菌群 有意差解析

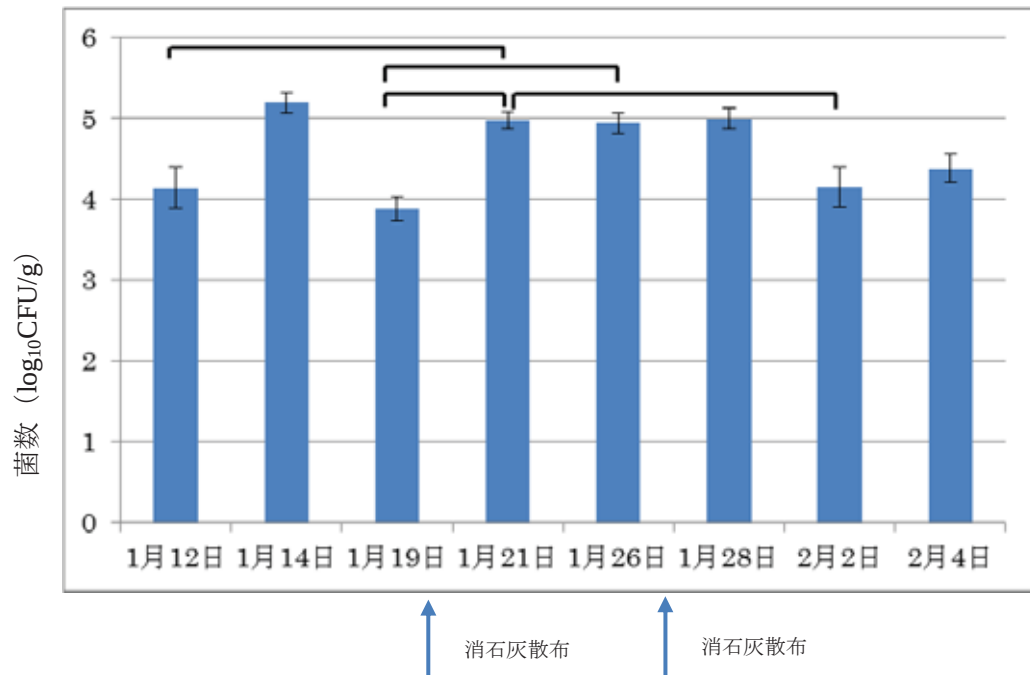


図3-10. グループb (牛房に10 kg/回の消石灰散布) 大腸菌 有意差解析

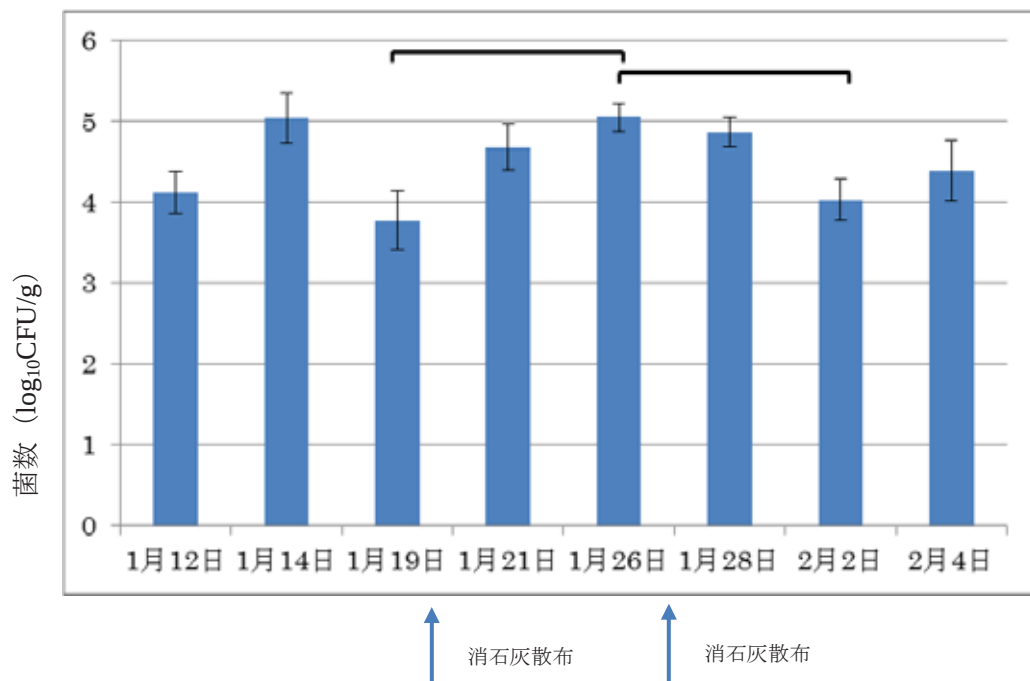


図3-11. グループb (牛房に10 kg/回の消石灰散布) 腸内細菌科菌群 有意差解析

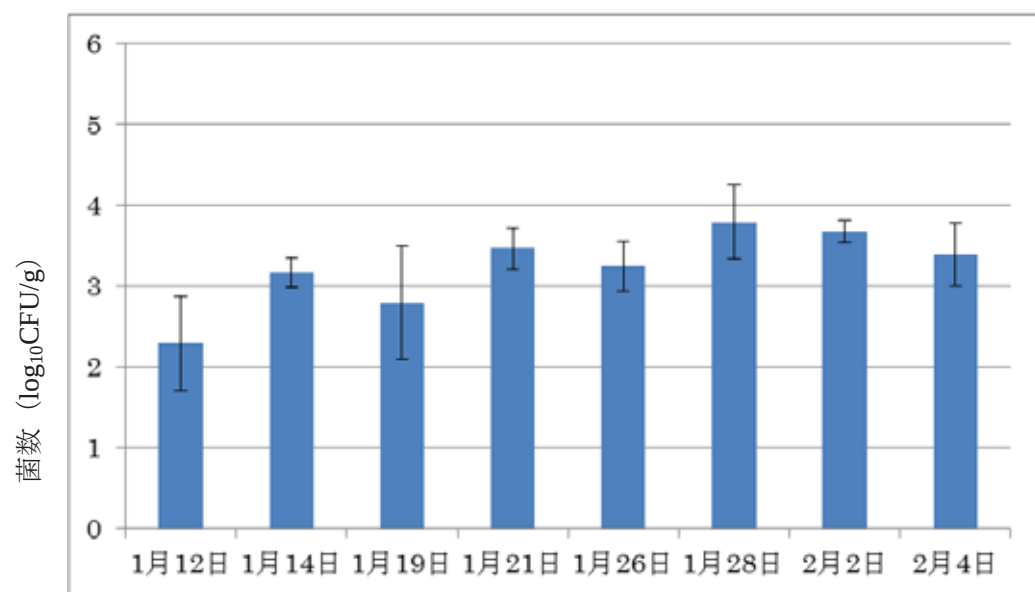


図3-12. グループc (牛房に消石灰散布なし) 大腸菌 有意差解析

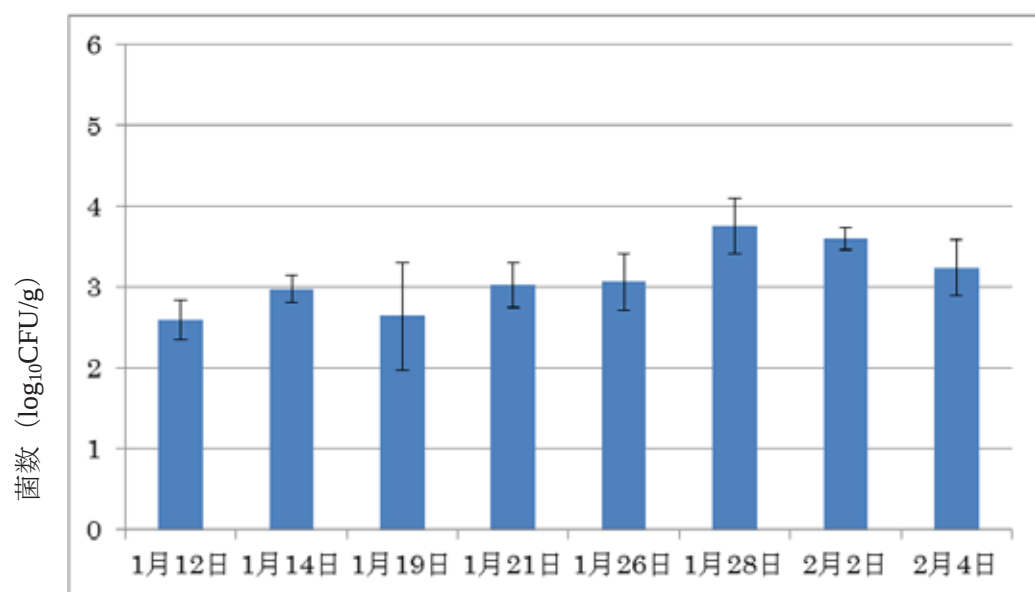


図3-13. グループc (牛房に消石灰散布なし) 腸内細菌科菌群 有意差解析

表 3－6．消石灰散布試験 大腸菌の菌数測定結果 (CFU/g)

|     | 1月12日   | 1月14日   | 1月19日   | 1月21日   | 1月26日   | 1月28日   | 2月2日    | 2月4日    |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| a-1 | 2.2E+03 | 1.4E+04 | 5.0E+03 | 9.0E+03 | 2.0E+04 | 3.0E+04 | 5.1E+03 | 3.2E+03 |
| a-2 | 2.5E+03 | 4.7E+03 | 6.0E+02 | 5.0E+03 | 3.2E+03 | 1.9E+04 | 5.9E+03 | 1.4E+04 |
| a-3 | 4.6E+04 | 4.1E+03 | 2.8E+03 | 4.1E+03 | 1.0E+04 | 2.8E+04 | 7.1E+03 | 4.2E+03 |
| a-4 | 3.7E+03 | 3.7E+03 | 1.6E+03 | 2.5E+03 | 9.0E+03 | 1.0E+04 | 2.5E+04 | 6.0E+03 |
| a-5 | 1.3E+04 | 1.4E+04 | 2.0E+03 | 3.0E+03 | 1.1E+04 | 7.0E+03 | 1.0E+05 | 2.8E+04 |
| a-6 | 5.5E+03 | 6.3E+05 | 4.0E+04 | 4.0E+04 | 6.0E+04 | 1.9E+06 | 1.0E+04 | 1.0E+04 |
| b-1 | 5.3E+04 | 4.7E+05 | 3.3E+03 | 2.3E+05 | 5.0E+04 | 4.7E+04 | 1.0E+04 | 1.8E+03 |
| b-2 | 1.4E+03 | 9.3E+04 | 8.0E+02 | 1.4E+04 | 2.0E+05 | 2.0E+05 | 4.2E+03 | 1.7E+04 |
| b-3 | 1.3E+04 | 9.8E+04 | 3.5E+03 | 7.0E+04 | 2.7E+04 | 5.1E+04 | 1.6E+04 | 8.0E+04 |
| b-4 | 1.3E+04 | 2.1E+04 | 3.7E+04 | 2.4E+05 | 1.0E+05 | 7.5E+04 | 3.7E+04 | 1.2E+05 |
| b-5 | 4.2E+04 | 1.1E+06 | 7.8E+04 | 1.5E+05 | 1.9E+05 | 2.9E+05 | 2.3E+04 | 2.8E+04 |
| b-6 | 1.3E+05 | 3.0E+06 | 2.2E+05 | 2.0E+06 | 1.5E+06 | 9.8E+05 | 5.0E+05 | 1.3E+06 |
| c-1 | 3.0E+02 | 2.3E+03 | 1.0E+00 | 2.0E+03 | 2.0E+02 | 1.7E+03 | 6.2E+03 | 1.0E+02 |
| c-2 | 8.0E+02 | 1.2E+03 | 5.3E+03 | 1.3E+03 | 6.0E+02 | 1.1E+04 | 1.5E+03 | 1.7E+04 |
| c-3 | 6.0E+02 | 6.0E+02 | 1.6E+03 | 2.1E+03 | 4.2E+03 | 2.0E+02 | 4.7E+03 | 4.7E+03 |
| c-4 | 1.0E+00 | 7.0E+02 | 4.4E+03 | 1.3E+03 | 3.8E+03 | 8.2E+04 | 1.1E+04 | 1.2E+03 |
| c-5 | 2.0E+03 | 6.1E+03 | 2.5E+03 | 3.0E+04 | 9.0E+03 | 3.0E+04 | 5.1E+03 | 9.3E+03 |
| c-6 | 1.9E+04 | 2.8E+05 | 1.0E+04 | 1.0E+06 | 4.1E+05 | 4.0E+04 | 4.0E+05 | 7.4E+05 |

表 3－7．消石灰散布試験 腸内細菌科菌群の菌数測定結果(CFU/g)

|     | 1月12日   | 1月14日   | 1月19日   | 1月21日   | 1月26日   | 1月28日   | 2月2日    | 2月4日    |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| a-1 | 3.2E+03 | 1.0E+04 | 4.7E+03 | 5.0E+03 | 2.4E+04 | 2.0E+04 | 5.7E+03 | 2.9E+03 |
| a-2 | 4.0E+03 | 6.0E+03 | 1.0E+03 | 2.5E+03 | 4.4E+03 | 1.5E+04 | 6.7E+03 | 1.6E+04 |
| a-3 | 3.7E+04 | 6.0E+04 | 3.5E+03 | 6.0E+03 | 7.0E+03 | 3.0E+04 | 9.8E+03 | 8.0E+03 |
| a-4 | 5.6E+03 | 1.7E+04 | 3.4E+03 | 2.8E+03 | 2.2E+04 | 1.1E+04 | 1.6E+05 | 1.4E+05 |
| a-5 | 2.0E+04 | 1.6E+04 | 2.6E+03 | 2.4E+03 | 1.8E+04 | 9.0E+03 | 1.5E+05 | 3.0E+04 |
| a-6 | 1.0E+04 | 6.0E+05 | 6.0E+04 | 5.0E+04 | 5.0E+04 | 1.6E+06 | 1.0E+04 | 1.0E+04 |
| b-1 | 5.0E+04 | 4.1E+05 | 3.3E+03 | 1.6E+05 | 9.0E+04 | 2.3E+04 | 7.3E+03 | 1.7E+03 |
| b-2 | 1.5E+03 | 6.0E+04 | 6.0E+02 | 4.0E+03 | 2.9E+05 | 1.5E+05 | 1.6E+03 | 9.0E+03 |
| b-3 | 1.1E+04 | 5.9E+04 | 2.6E+03 | 5.0E+04 | 2.8E+04 | 4.1E+04 | 9.4E+03 | 2.1E+05 |
| b-4 | 1.4E+04 | 1.6E+04 | 2.4E+04 | 1.4E+05 | 1.3E+05 | 6.3E+04 | 4.3E+04 | 1.1E+05 |
| b-5 | 3.3E+04 | 7.2E+05 | 6.4E+04 | 5.9E+04 | 2.0E+05 | 2.4E+05 | 3.0E+04 | 2.7E+04 |
| b-6 | 1.4E+05 | 2.0E+06 | 2.2E+05 | 2.0E+06 | 1.8E+06 | 1.0E+06 | 7.0E+05 | 1.2E+06 |
| c-1 | 1.0E+02 | 8.0E+02 | 1.0E+00 | 6.0E+02 | 1.0E+02 | 1.5E+03 | 3.2E+03 | 1.0E+02 |
| c-2 | 7.0E+02 | 8.0E+02 | 5.2E+03 | 3.0E+02 | 3.0E+02 | 7.1E+03 | 1.7E+03 | 7.4E+03 |
| c-3 | 8.0E+02 | 4.0E+02 | 1.0E+03 | 7.0E+02 | 3.3E+03 | 7.0E+02 | 2.8E+03 | 4.9E+03 |
| c-4 | 1.0E+02 | 7.0E+02 | 2.9E+03 | 9.0E+02 | 3.1E+03 | 6.2E+04 | 1.0E+04 | 8.0E+02 |
| c-5 | 1.7E+03 | 4.0E+03 | 1.0E+03 | 1.2E+04 | 7.0E+03 | 1.3E+04 | 6.6E+03 | 5.4E+03 |
| c-6 | 2.1E+04 | 3.1E+05 | 2.0E+04 | 1.0E+06 | 4.6E+05 | 2.0E+04 | 2.9E+05 | 5.9E+05 |