

平成24年度

第50回広島県畜産関係業績発表会集録

と き 平成25年1月18日
ところ 県庁本館講堂
(広島市中区基町 10-52)

広島県

目 次

(第 50 回)

○ 1. GIS を活用した防疫体制の確立	1	北部畜産事務所	萬城 守郎
2. 羊の仮性結核症の発生事例	7	西部畜産事務所	久保 由美子
3. 豚におけるアカバネウイルス感染症の発生例	12	東部畜産事務所	本多 俊次
4. 西農ポークのうまみに関する研究	18	県立西条農業高等学校	篠原 まるみ
5. 万能細胞を利用した遺伝子組換え動物作出に向けた研究	23	県立西条農業高等学校	小笠原 唯衣
6. 飼料イネホールクロップサイレージ給与による肥育試験 Part 3	31	県立庄原実業高等学校	山王 文哉
7. 花咲く神石高原町「ミツバチ」から広がる交流・里山保全	36	県立油木高等学校	内藤 哲也
8. 肉用鶏農場における伝染性喉頭気管炎 (ILT) の発生事例	39	東部畜産事務所	部屋 智子
9. 広島県内で発生した伝染性喉頭気管炎 (ILT)	44	西部畜産事務所	藤田 敦子
○ 10. 採卵鶏飼養農場で発生した伝染性喉頭気管炎 (ILT)	49	北部畜産事務所	五反田 桃子
11. <i>Enterococcus faecalis</i> による牛の死産事例	54	西部畜産事務所	兼廣 愛美
12. <i>Pasteurella multocida</i> による乳用牛の乳房炎	59	北部畜産事務所	上川 真希佳
13. 酪農家における下痢症対策と初乳検査の有用性	62	北部畜産事務所	細川 久美子
14. 広島県内で流行した牛 RS ウイルス病	65	西部畜産事務所	清水 和
◎ 15. 和牛農家の担い手で組織されたコントラクターと集落法人等との稲わら収集を通じた 耕畜連携の推進	70	西部畜産事務所	中市後 章子
16. 管内における稲発酵粗飼料の取組み状況	73	東部畜産事務所	松本 早織
17. ワンショット過剰排卵処置による体内受精胚の効率的生産の検討	76	畜産技術センター	横田 文彦

18. 周産期疾病多発牛群に対するルーメンフィルスコアを用いた牛群検診の一事例…79
NOSAI 広島 家畜臨床研修所 黒瀬 智泰
19. 高体細胞数牛群への乳質改善アプローチ例 ……88
NOSAI 広島 山県家畜診療所 篠塚 康典
20. 管内一酪農家で発生した多剤耐性サルモネラニューポート感染症 ……94
NOSAI 広島 三次家畜診療所 檜山 尚子

◎ : 第54回全国家畜保健衛生業績発表会 発表演題

○ : 第54回中国・四国ブロック家畜保健衛生業績発表会 発表演題

GIS を活用した防疫体制の整備

1) 北部家畜保健衛生所 2) 畜産課

○ 萬城守郎 1) 尾崎充彦 2)

はじめに

Geographic Information System (GIS) は、地理情報システムと言われ、コンピュータ上に地図情報やさまざまな付加情報を持たせ、作成・保存・利用・管理し、地理情報を参照できるように表示・検索機能をもったシステムであり、人工衛星、現地踏査などから得られたデータを、空間、時間の面から分析・編集することができ、科学的調査、土地、施設や道路などの地理情報の管理、都市計画などに利用されている。

今回、無償で提供されている GIS である、グーグルマップ及び電子国土を用い、誰でも簡単に効率よく農家位置情報等を得るためのツール型マップを作成し、正確な農家位置情報等の家畜防疫マップシステムへの入力を可能にするとともに、消毒ポイント情報等を記載した、公開型マップを作成し、県ホームページあるいは PDF ファイルにより市町、関係団体、県民へ情報提供するための体制を構築したので報告する。

方法

1. GIS

地図の作成には、無料で提供されているグーグル社グーグルマップ及び国土地理院提供電子国土 Ver2 を使用し、それぞれの地図は HTML ファイル内にそれぞれの Application Programming Interface (API) を用いて JAVA スクリプトにより記述した。(表 1)

今回、API として Google maps API ver. 3 及び電子国土 Web システム API を使用した。

2. 地図の作成

誰でもデータを入力すればすぐ使えるツール型地図として、グーグルマップを用いて、発生農場等の緯度・経度の確認及び埋却地等の面積の測定マップ及び道程確認マップを作成。また、グーグルマップ及び電子国土を用いた公開型地図として公開用・配布用消毒ポイントマップを作成した。この公開用・配布用消毒ポイントマップ用の消毒ポイントの位置情報の管理には Microsoft EXCEL2002 を用いた。

(1) 発生農場等の緯度・経度の確認及び埋却地等の面積の測定マップの機能 (図 1)

- ・ 当所に登録されている農場の緯度・経度情報を入力することによる地図上に農場位置がマークされその位置情報が確認可能である。またその位置情報が実際の位置と違う場合、修正された位置情報の表示が可能
- ・ 地図上の 2 点間の直線距離が測定可能
- ・ 地図上にプロットされた多角形の面積が測定可能

(2) 道程確認マップの機能 (図 2)

- ・緯度経度情報または住所情報から設定されたスタート地点 A と目的地 B の 2 点間の車による道程の設定と推定所要時間の表示が可能

- ・地図上に制限区域等の同心円及び消毒ポイント等のマーカーの描画表示が可能

(3) 公開用・配布用消毒ポイントマップの活用（表 2）（図 3～図 5）

危機管理の事前対応としてエクセル及びグーグルマップにより各農場の消毒ポイント候補を作成し、消毒ポイントリストをエクセルファイルにより保存した。また、地図を HTML ファイルにより保存した。

疑い例発生時においては、グーグルマップあるいは電子国土地図により地図を作成し、電子国土地図は、市町へ情報提供し、消毒ポイント設置の協力を依頼する。

その後、疑似患畜決定後は、これらの地図を速やかに、インターネット上に公開するとともに、紙ベースでも関係機関と共有できる体制を構築した。

成績及びまとめ

重大な動物感染症防疫対策でまず最初に行うことは、発生農場がどこにあるかの確認である。

今回作成した、GIS ツールを活用することにより、畜産事務所で把握している、農場の位置情報の確認と修正が容易になり、また愛玩鶏飼育者等で住所情報しか把握していない場合の飼育者位置情報の確認も容易になった。

また、殺処分家畜等の埋却予定地の位置情報、面積、発生農場からの直線距離も容易に計測できることから、迅速な初動防疫の開始が可能となった。

道程確認マップの活用により、動員者集合場所、発生現地、中継基地及び消毒ポイントへの防疫作業従事者運搬車両、畜産関係車両の効率的な道程（ルート）が簡易に作成することが可能となった。

公開用・配布用消毒ポイントマップを活用することで重大な動物感染症防疫対策の事前対応として消毒ポイント候補地を容易に決定できるようになり、各農場の消毒ポイント候補地を予め作成し保管することが可能となった。

また、関係機関、県民と地図情報を共有化することにより、迅速な初動防疫の開始と迅速な情報公開が可能となった。

表 1 Google Maps API V3 を用いたスクリプト例

```

<html>
<head>
<!-- GoogleMapで緯度経度情報をチェックV9.2 -->
<meta name="viewport" content="initial-scale=1.0, user-scalable=no" />
<meta http-equiv="content-type" content="text/html; charset=shift_jis"/>
<link rel="stylesheet" type="text/css" href="default.css">
<title>GoogleMaps で位置情報を修正しよう！ </title>
<script type="text/javascript"
src="http://maps.google.com/maps/api/js?sensor=false&libraries=geometry"> </script
>
<script type="text/javascript">
//アイコン
var Image = "";
//ジオコーディングのインスタンス
var geocoder;
//ジオコーディング結果のステータス
var gs = google.maps.GeocoderStatus;
//緯度経度用
var x,y,dx,dy;
//次の変数はグローバル変数 map
var map;
// Create a measure object to store our markers, MVCArrays, lines and polygons
var measure = {

```

表 2 公開用・配布用消毒ポイントマップの活用

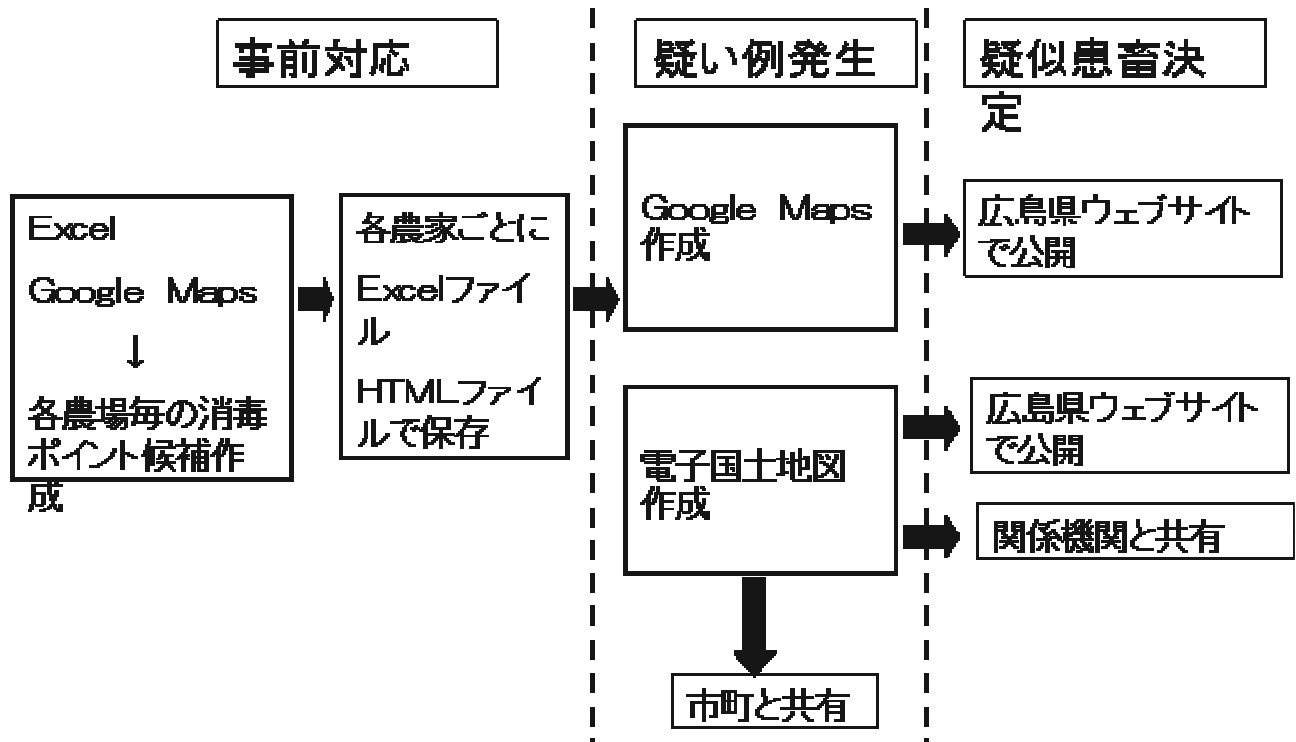


図 1 発生農場等の緯度・経度の確認
及び埋却地等の面積の測定マップ

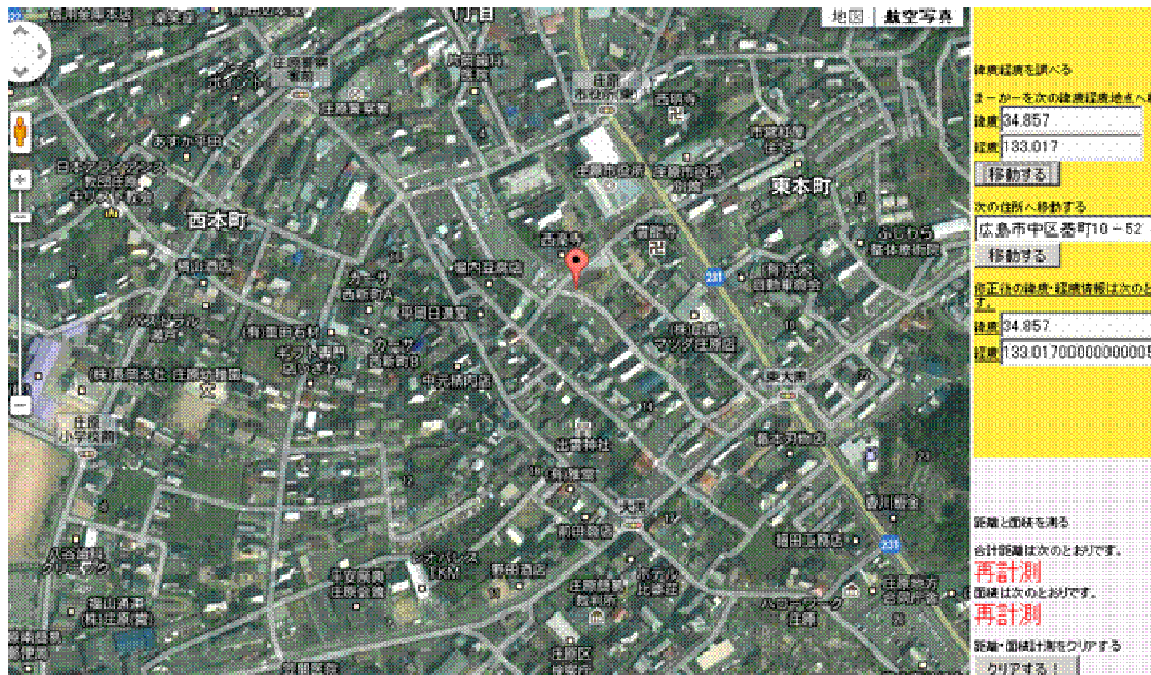


図 2 道程確認マップ

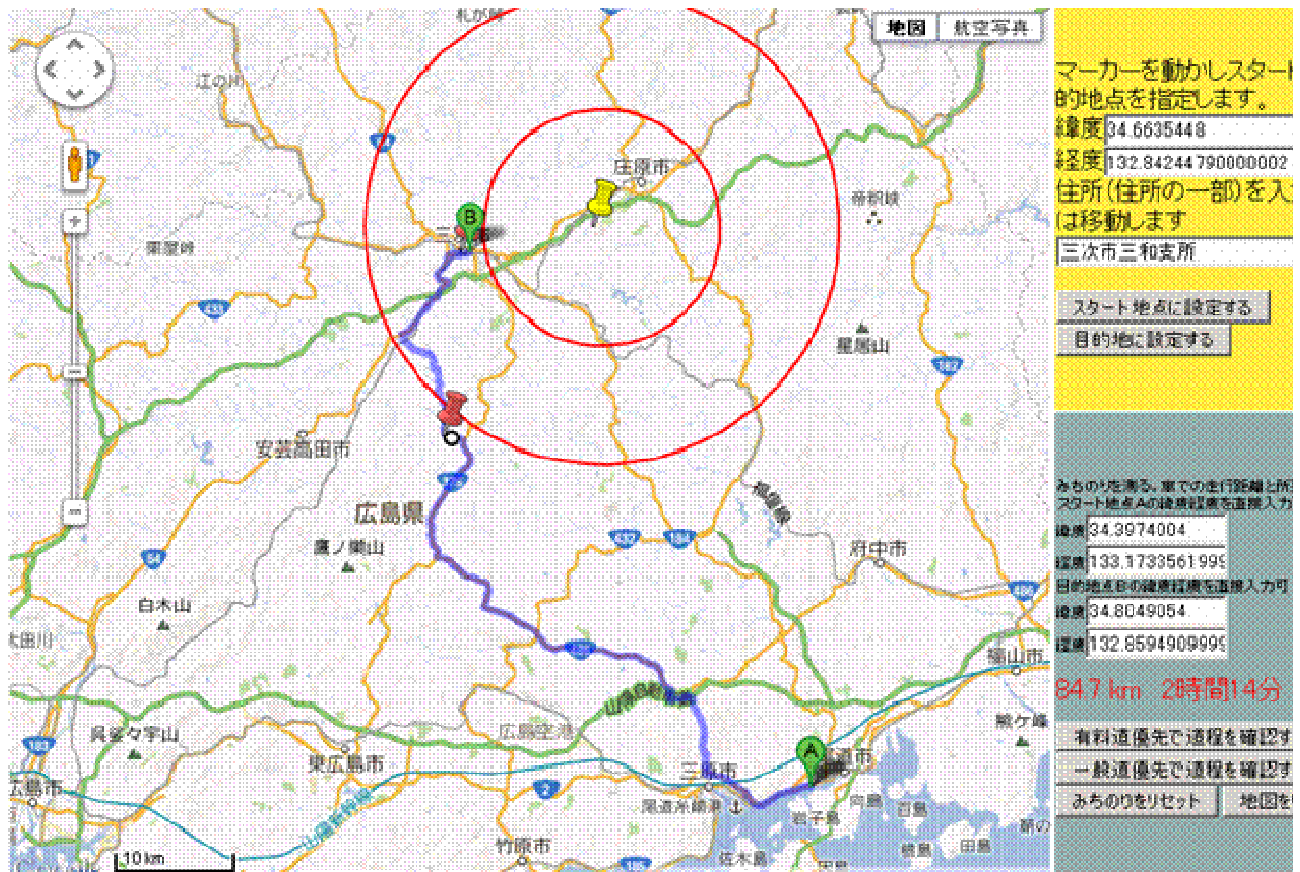


図 3 公開用・配布用消毒ポイントマップ
(消毒ポイントリスト)

	O	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
2	地図の縮尺	10		地図のサイズ(幅:高) ピクセル	800	900					
3									ポイントの追加	ポイントの削除	
4				経緯	移動規制半径Km	飛出制限半径Km					
5	地図の中 半角文字は入力できません 数字を含めて全部半角文字で入 力してください			132.980971							
6	発生地			132.980971	10	20					消毒ポイントモント
7		34823422		132.980971		1					
11	消毒ポイント1	3464061		132.98433	SS227 (みわ305)	三次市三和町上巻2000-		23.4	km		
12	消毒ポイント2	34.97807		133.13707	SS216 (無野チェーン)	庄原市西城町無野		22.3	km		各家別エクセルファイル及びマップH TMLを作成する！(更新する) 地図をみる
13	消毒ポイント3	34.98424		132.78023	SS231 (三次市南野支所)	三次市南野町上布野11-		19.8	km		
14	消毒ポイント4	34.702956		133.115797	SS108 (上下運動公園)	府中市上下町上下		19.2	km		
15	消毒ポイント5	34.98040		132.98802	SS220 (庄原市比和支所)	庄原市比和町比和1119-		17.8	km		
16	消毒ポイント6	34.7195		132.99306	SS230 (三次市吾妻支所)	三次市吾妻町吾妻368		11.6	km		既存データをインポートする
17	消毒ポイント7	34.78391		133.07411	SS222 (庄原市追分支所)	庄原市追分町下積家200		9.6	km		パッケージング
18	消毒ポイント8	34.93737		133.01400	SS209 (庄原市川北小倉)	庄原市川北町		8.7	km		
19	消毒ポイント9	34.90062		132.90962	SS224 (樹立みよし公園)	三次市四拾遺町神田谷		7.0	km		印刷
20	消毒ポイント10	34.84733073		133.0225625	SS312 (庄原IC)	庄原市板橋町		4.6	km		
21	消毒ポイント11	34.81868		133.02014	S1046	庄原市実習町		2.5	km		
22	消毒ポイント12	34.92926		132.957	S1577	庄原市山内町		2.3	km		
23	消毒ポイント13	34.83889		132.98359	S1544	庄原市七塚町		1.7	km		
24	消毒ポイント14	34.82094		132.97801	S1584	庄原市山内町		0.6	km		
25	消毒ポイント15	34.8186		132.97823	S1585	庄原市山内町		0.6	km		

図 4 公開用・配布用消毒ポイントマップ
(グーグルマップ版)

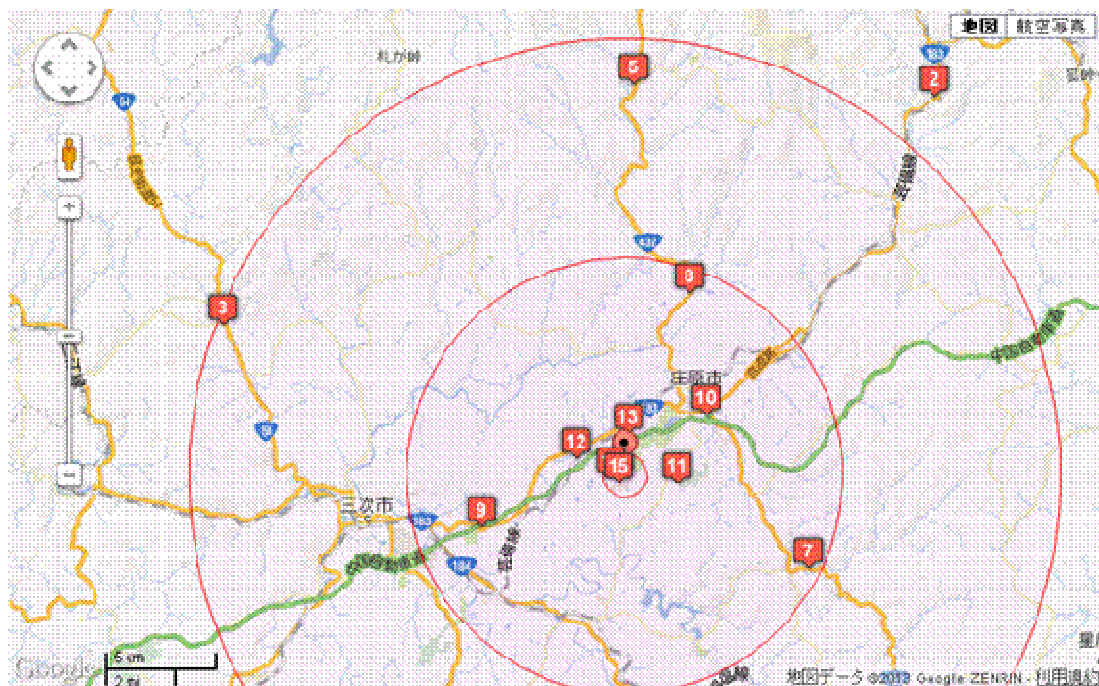
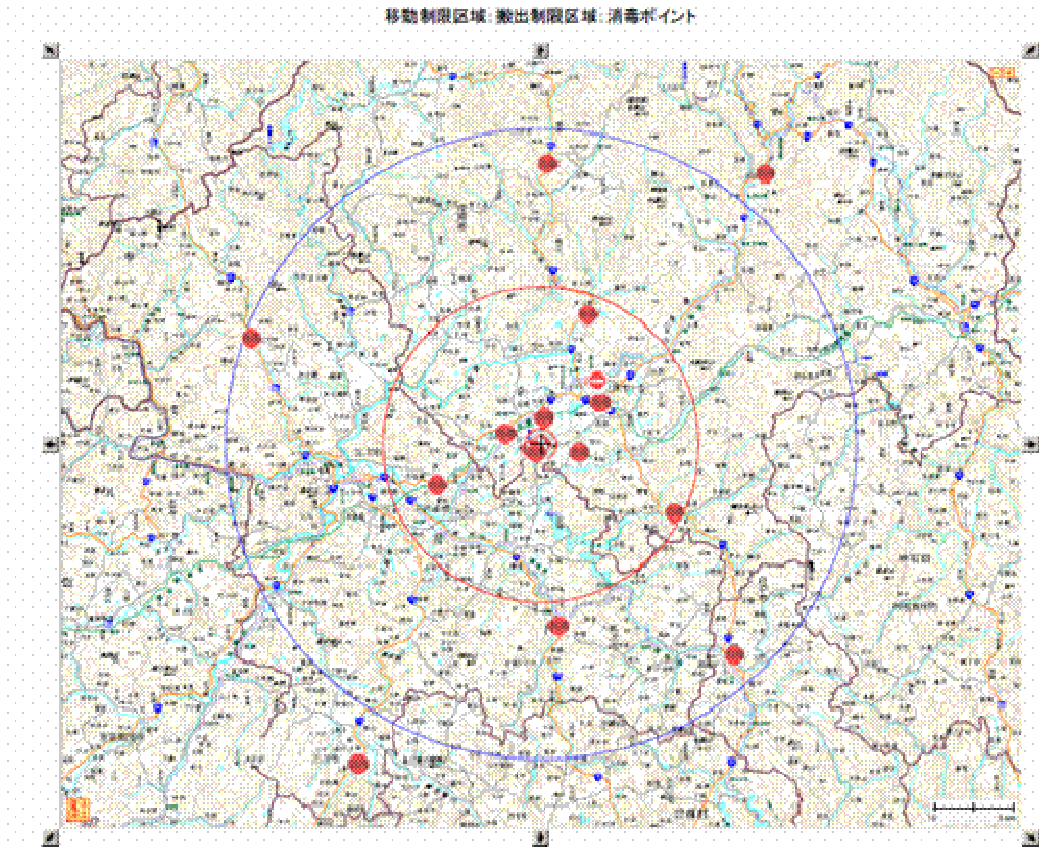


図 5 公開用・配布用消毒ポイントマップ (電子国土版)



羊の仮性結核症の発生事例

西部畜産事務所

○久保由美子 田村和穂

はじめに

羊の仮性結核症は *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. P*) が原因で起こる乾酪性リンパ節炎で、主に毛刈り時等の創傷から感染¹⁾し、身体各部のリンパ節及び臓器、特に肺に膿瘍を形成する²⁾慢性疾患である。北海道ではELISA法により抗体検査を実施したところ、約39%の羊が抗体陽性であった³⁾という報告もある羊の重要疾病である。また、本菌は馬で潰瘍性リンパ節炎等の原因となり、人にも感染事例のある人獣共通感染症^{2,4,5)}である。

平成24年9月5日、管内の羊飼養農家において、約31ヶ月齢の繁殖雌羊1頭が突然起立不能となり、翌日死亡した。病性鑑定の結果、*C. P*による羊の仮性結核症と診断したため、発生要因及び対策について検討した。

材料

死亡したサフォーク種、約31ヶ月齢（平成22年2月生、自家産）の繁殖雌羊について、病性鑑定を実施した。

方法

1. 疫学調査

発生及び飼養状況、毛刈りの状況及び放牧地の状況について、農場に立入りし、畜主から聞き取り調査した。また、当該農場から出荷され、食肉処理場で処理された羊肉の食肉衛生検査成績を調査した。

2. 病性鑑定

1) 病理学的検査

剖検し、肺及び下顎リンパ節をホルマリン固定後、定法を用いて切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色及びグラム染色を実施した。

2) 細菌学的検査

無菌的に採材した肺を生理食塩水により乳剤化、Trypticase soy broth により 10 倍階段希釈し、37°C24 時間増菌後、5%羊血液寒天培地を用いたローソク培養及び嫌気培養、ならびに DHL 寒天培地を用いた好気培養を、37°C24 時間実施した。

また、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、脳、下顎リンパ節を無菌的に採材し、スタンプ法により直接塗抹した 5%羊血液寒天培地をローソク培養及び嫌気培養、馬血液寒天培地ならびに DHL 寒天培地を好気培養で、37°C24 時間培養した。

さらに、分離した菌について、一濃度ディスク拡散法により、ペニシリン、アンピシリン、ジクロキサシリン、セファゾリン、セファロキシム、セファピリン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、オキシテトラサイクリン、エリスロマイシン、ホスホマイシンの 12 薬剤について薬剤感受性試験を実施した。

3) 伝達性海綿状脳症 (TSE) 検査

延髄・扁桃を材料とし、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所に検査を依頼した。

成績

1. 疫学調査

1) 飼養状況

発生農家はサフォーク種の羊約60頭を飼養する一貫生産農家であり、平成19年から飼養を開始し、平成21年から肥育した羊を肉用に出荷しており、広島市食肉市場で処理を行っている。初代繁殖雌羊及び種雄は北海道から導入しており、その他は自家生産している。子羊は畜舎内で飼養し、親羊は初夏から秋は放牧地で昼夜放牧、冬から春は畜舎で飼養している。

2) 発生状況

患畜は9月5日14時頃畜主が巡回した際は異常を認めなかったが、同日15時頃放牧地にて起立不能を呈した羊1頭を発見し、羊舎に収容した。セファゾリン3ml及び補液剤500mlを投与したところ、一時は回復の傾向を見せたが、翌6日朝、死亡を確認した。

3) 毛刈りの状況

農場では年に1度春に繁殖用雌羊の毛刈りを実施している。平成22年生まれである患畜は、平成23年及び24年の春にそれぞれ1回、計2回の毛刈りを経験していた。毛刈りは羊毛刈り用のバリカン及びハサミを用いて行われており、実施の際には必ず創傷がみられることから、ヨード剤の噴霧による消毒を実施していた。なお、羊の飼養を開始した当初は、不慣れなことから毛刈り実施毎に大きな裂傷ができていた。また、使用する器具は1頭ごとの消毒を実施しておらず、毛刈りの順序に決まりはなく、捕まえた羊から実施していた。

4) 放牧地の状況

農場は山に囲まれ、1.2ha①と1.5ha②の放牧地を有しており(図1)、草の状況を見ながら交互に放牧を行っていたが、主に使用されている放牧地②において、羊は入り口付近の盛り土部分に密集していた。この放牧地は草が豊富に生え、森に囲まれているため周辺に木陰も多いが、羊は真夏の炎天下においても移動することなく、殆どの時間を盛り土の上で過ごしていた。このため、密集部の土壌は泥濘化しており、また、泥濘化した土壌で羊の腹部は常に汚染されていた(写真1,2)。さらに、日除けがない場所に密集しているため、夏季は常に暑熱によるストレスにさらされていた。

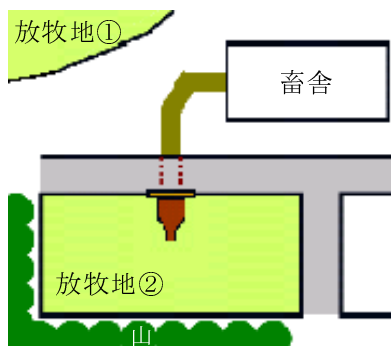


図1: 農場見取り図



写真1: 泥濘化した土壌



写真2: 腹部の汚れた羊

4) 出荷成績調査

平成24年には12月までに12ヶ月齢未満の羊7頭を出荷したが、臓器・筋肉等に異常は認められなかった。

2. 細菌学的検査

1) 細菌分離

肺実質から 10^3 cfu/g のオキシダーゼ陽性・カタラーゼ陰性のグラム陽性短桿菌を分離した。また、下顎リンパ節からも同様の菌を純培養状に分離し、API CORYNE を用いて同定した結果、*Corynebacterium pseudotuberculosis* と判定した。その他の臓器については、細菌分離陰性だった(表1, 2)。

2) 薬剤感受性試験

ペニシリン系及びアミノグリコシド系、ホスホマイシンに耐性がみられたが、今回治療に用いたセファゾリンについては、感受性があった(表3)。

表1:API CORYNE V3.0 判定結果

NIT	PYZ	PyrA	PAL	βGUR	βGAL	αGLU	BNAG	ESC	URE	GEL	O	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT
-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
菌種名		% ID	T																	
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>		99.5	1.0																	

表2:細菌分離結果

部位	菌量
肺	10^3 cfu/g
下顎リンパ節	∞
心臓	—
腎臓	—
肝臓	—
脾臓	—
脳	—

表3:薬剤感受性試験結果

薬剤	感受性判定
ペニシリン	I
アンピシリン	I
ジクロキサシリン	R
セファゾリン	S
セファロキシム	S
セファピリン	S
カナマイシン	R
ゲンタマイシン	R
ストレプトマイシン	R
オキシテトラサイクリン	S
エリスロマイシン	S
ホスホマイシン	R

※S:感受性 I:中間 R:耐性

3. 病理学的検査

1) 剖検所見

下顎、顔面及び腹部等に皮下浮腫を認めた。胸腔内には著しい線維素の析出を認め、肺は胸壁と癒着し、全体に薄緑色を呈する拇指頭大～胡桃大の膿瘍を多数形成していた(写真3)。心嚢膜も線維素が析出しており肺と癒着していた。横隔膜表面にも薄緑色を呈する胡桃大の膿瘍形成を認めた(写真4)。



写真 3:多数の膿瘍が形成された肺



写真 4:胸腔内に形成された膿瘍

2) 病理組織学的検査

肺では、肺胞壁に軽度のうっ血、肺胞腔内に中程度の漿液の貯留及び軽度のマクロファージの浸潤が認められ、膿瘍部においては、グラム陽性桿菌を伴う退廃物を中心に周囲を好中球及びマクロファージが取り囲み、さらにその周囲にリンパ球の浸潤を伴う結合組織の形成が認められた（写真5,6）。下顎リンパ節でも同様に、膿瘍とそれを取り囲む結合組織の形成と、グラム陽性桿菌を認めた。

また、心冠部脂肪組織の容積は減少し、その間隙へ漿液の貯留が認められた。

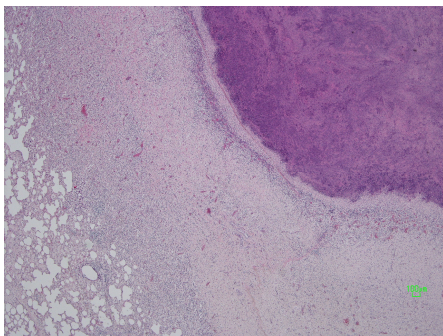


写真 5:肺に形成された膿瘍及び結合組織
(ヘマトキシリン・エオジン染色)

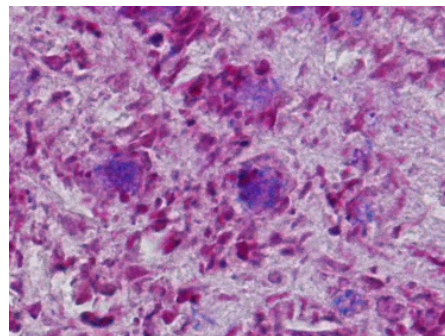


写真 6:境界部にみられたグラム陽性桿菌
(グラム染色)

3) 伝達性海綿状脳症（TSE）検査

ウェスタンブロット法、免疫組織化学的検査を実施したところ、陰性だった。

まとめ及び考察

羊の死亡原因は、*C.P.*の感染により肺に膿瘍が形成され、慢性の呼吸器不全及び循環機能障害に陥っていたところに暑熱等のストレスが加わることで機能不全を起こし、呼吸困難を呈したものと思われる。*C.P.*は長期間土の中に棲息する土壌菌⁶⁾であり、皮膚の傷等を通して体内に侵入する。したがって、初期に導入された羊が無症状ながら本菌を保有しており、毛刈り等による創傷部から外部へ本菌を排出したため、①放牧地の汚染、②羊同士の密着、③器具の汚染等から当該羊の創傷部を介して感染が成立したものと推測する。さらに、羊が密集する盛り土部分の周囲には日除けはなく、暑熱等のストレスも受けやすい状態にあったと思われる。

当該農場は現在も*C.P.*に汚染されていると思われるため、新たな感染を予防することは重要である。本

症は抗生物質等による予防は効果が薄く^{2,7)}、最も重要な予防方法は、創傷を作らないことと創傷時のヨードによる適切な消毒である^{6,7)}。したがって、対策として①毛刈りは清潔な環境・器具で行う、②汚染を広げないため、若い羊から実施する、③釘や有刺鉄線の使用を避け、羊が傷を作らない環境に留意する、④創傷時はヨード剤を塗布し丁寧に消毒する、⑤清潔な飼養環境で飼養し、密飼を避ける、等を適切に実施する必要がある。また、人獣共通感染症であることから、飼養者自身も創傷時には消毒を徹底する等の処置が必要であり、本症について羊飼養者に注意を喚起するとともに、適切な飼養衛生について指導を行っていく必要がある。

これまで本県では、本症に関する報告は殆どみられず、あまり認識されていなかったが、*C.P*は羊のみならず、馬に感染すると胸部や腹部側面に膿瘍を形成するいわゆる「ハト熱」や潰瘍性リンパ節炎を引き起こし^{2,8)}、また、まれではあるが牛にも化膿性リンパ節炎などの症状を引き起こす⁴⁾、感受性動物の多い菌であるため、今後*C.P*についても留意した病性鑑定を行っていく必要があると思われる。

参考文献

1. Serizawa,S., Ito,S., et al. 1993. Seroepidemiological Evidence that Shearing Wounds are Mainly Responsible for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Sheep. *The journal of veterinary medical science*. 55(4) : 691-692
2. 家畜感染症 上
3. Chikamatsu,S., Zhao,H.K., et al. 1989. Seroepidemiological Survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Sheep in Japan using Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion. *Jpn.J.Vet.Sci.*51 : 887-891
4. Fernanda,A.D., Luis,G.C.P., et al. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology,biochemical properties, pathogenesis and molecularstudies of virulence. *Vet. Res.* 37 : 201-218
5. Margaret,M.P., Gregory,G.P., et al. 1997. Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. *Clinical Infectious Diseases*. 24(2) : 185-191
6. Alessandro,S.G., et al. 2011. CASEOUS LYMPHADENITIS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS, AND CONTROL. *The HIOAB Journal*.2 : 33-43
7. 芹川慎, めん羊の *Corynebacterium pseudotuberculosis*感染症の予防に関する研究, 北海道立農業試験場報告. 第84号 : 10-13
8. Reed,S.M., Bayly,W.M., Sellon,D.C., 2010. EQUINE INTERNAL MEDICINE 3rd Ed., *Saunders* : 515-516

豚におけるアカバネウイルス感染症の発生例

東部畜産事務所

○本多俊次 秋山昌紀

はじめに

アカバネ病は、ウシヌカカ等の吸血昆虫が病原体であるアカバネウイルス（以下、AKV）を媒介して、異常産あるいは神経症状を引き起こす牛の届出伝染病である。平成23年9月以降には、中国、四国九州地方において、子牛及び成牛の神経症状を主徴とするAKVの生後感染例が確認された。その同時期に、管内養豚場において、国内初の豚のAKV感染症例が確認されたので報告する。

発生概要

平成23年10月12日、管内一貫経営A農場において、9月24日娩出の産子10頭中5頭に、痙攣、ふらつき、犬座姿勢及び起立不能の神経症状を認め、病性鑑定を実施した。また、奇形胎子の娩出を伴う異常産が、A農場で10月下旬から、一貫経営農場B農場で10月中旬から発生し、更に、集中分娩に取り組んでいる一貫経営農場C農場において、11月上旬及び12月中旬の分娩期に合わせて発生が認められた。異常産の発生は、それぞれ12月下旬に終息した（図1）。各月の上中下旬におけるA及びB農場の異常産の発生について、総分娩数に対する奇形胎子の確認された分娩数の割合を示すと、発生のピークがA農場では11月下旬の46.0%、B農場では11月中旬の23.1%であった（図2）。

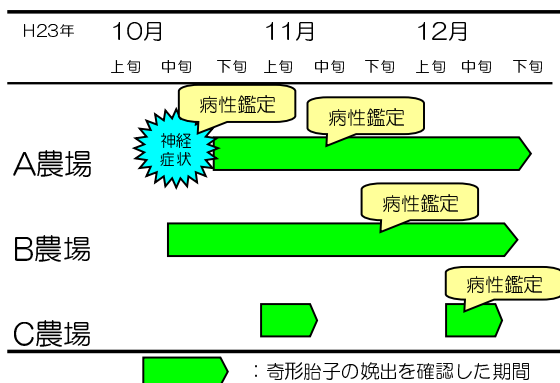


図1 発生概要

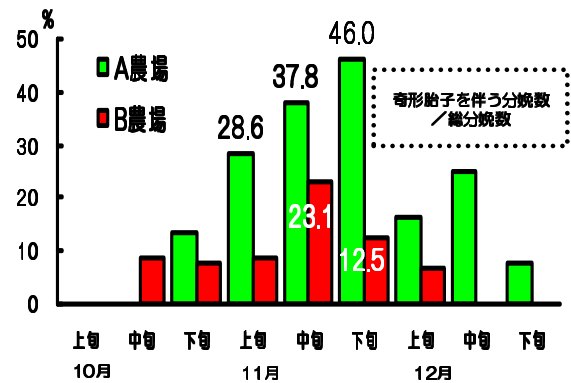


図2 A及びB農場での異常産の発症状況

材料及び方法

1 材料

神経症状の症例については、起立不能を呈した18日齢の哺乳豚2頭を安楽死後に鑑定した。

異常産の症例については、A農場で11月中旬に発生した3腹の異常産から奇形胎子を各1検体の計3検体、B農場で11月下旬に発生した1腹から同腹の2検体、及びC農場で12月中旬に発生した1腹1検体について、合計5腹6検体を鑑定した。また、当該母豚5頭及び同時期に異常産を発症した同居の繁殖母

豚（以下、同居母豚）A 農場 2 頭、B 農場 5 頭及び C 農場 5 頭の計 12 頭の血清を検査に供した。更に、C 農場を含む 2 農場において実施した日本脳炎抗体検査（平成 23 年度 家畜伝染病予防事業）の保存血清 40 検体（2 農場で未越夏豚 5 頭を 4 回採血）を用い、AKV の動向を確認した。

2 方法

哺乳豚及び奇形胎子の検査材料を用いて、病理解剖後、定法により病理組織学的検査ならびに抗 AKV ウサギ免疫血清による免疫組織化学的検査を実施した。哺乳豚については、蛍光抗体法による豚コレラ検査及び細菌学的検査を実施した。

ウイルス学的検査は、各種臓器乳剤を Vero 細胞及び CPK NS 細胞を用いてウイルス分離を実施した。また、脳幹あるいは脊髄の材料を用いて日本脳炎及び AKV に対する PCR 検査を実施した。

ウイルス性疾患の抗体検査は、奇形胎子の体液ならびに当該母豚及び同居母豚の血清を用いて、豚オーエスキー病（ラテックス凝集反応）、豚コレラ（ELISA 法）、日本脳炎（HI 反応）、豚パルボウイルス感染症（HI 反応）及び AKV（中和試験）について実施した。

成績

1 神経症状を呈した哺乳豚の症例

哺乳豚 2 頭の外貌及び剖検所見に著変は認められなかった。病理組織学的検査において、脳及び脊髄に円管性細胞浸潤及びグリア結節が見られる非化膿性脳脊髄炎が認められた（写真 1）。また、免疫組織学的検査において、脳幹部及び脊髄の神経細胞の細胞質内に AKV 抗原が確認された（写真 2）。

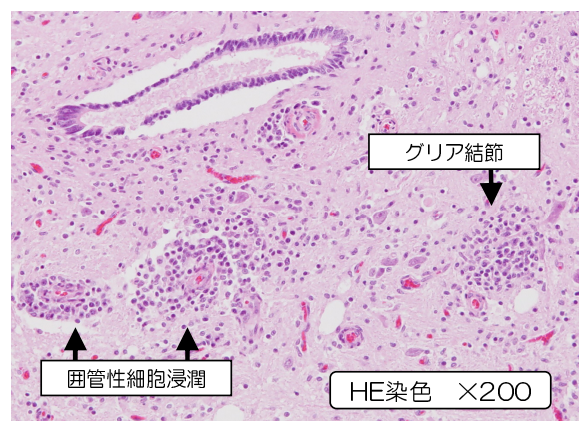


写真1 非化膿性脳脊髄炎（脊髄）

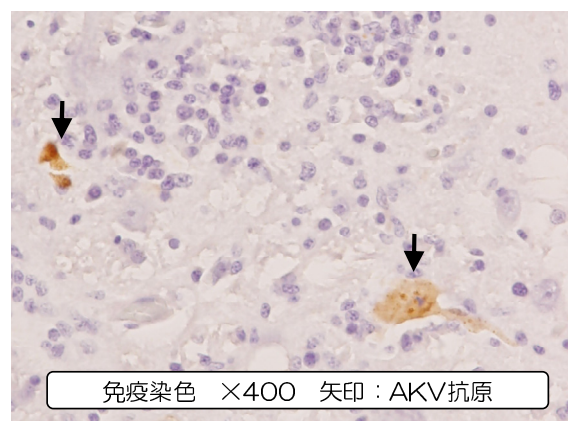


写真2 神経細胞質内のAKV抗原（脳幹）

PCR 検査において、日本脳炎の特異的遺伝子は検出されなかったが、2 頭の大脳及び小脳から AKV の特異的遺伝子が検出された。また、ウイルス分離において、1 頭の脳から AKV が分離された。これらのことから、哺乳豚の神経症状を AKV 感染症と診断した。

分離ウイルス株について、動物衛生研究所に分子系統樹解析を依頼した結果、1984 年に鹿児島県で分離された Iriki 株に代表される genogroup I に属していることが判明した（図 3）。また、この時期に当所管内で発生した牛の生後感染例から分離された AKV 株に対して、高い相同性を認めた（表 1）。なお、細菌学的検査で有意菌は分離されず、豚コレラ及び豚オーエスキー病の抗体検査についても陰性であった。

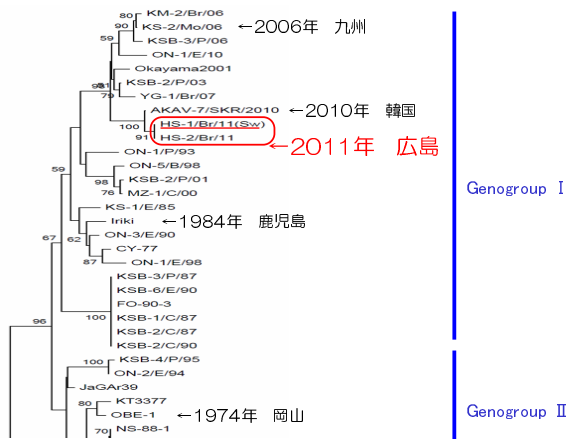


図3 S RNAセグメントの配列に基づく分子系統樹

表1 本症例分離株と発症牛分離株との比較

	相同性 (%)	
	塩基配列	アミノ酸配列
S RNAセグメント (双カプソド領域)	100	100
M RNAセグメント (外被タンパク質コード領域)	99.9	99.7
L RNAセグメント (RNAポリメラーゼコード領域)	100	100

・本症例分離株：HS-1/Br/11株
 ・発症牛分離株：HS-2/Br/11株

(独)食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 より情報提供

2 異常産の症例

胎子の外貌については、発育不全、四肢の屈曲あるいは伸展(写真3)、脊椎の湾曲(写真4)及び頭部の膨大(写真5)等の体形異常が認められた。6検体全てにおいて、脳の欠損(写真6)あるいは低形成(写真7)が認められ、脊椎は椎孔に対して明らかに低形成を示した(写真8)。

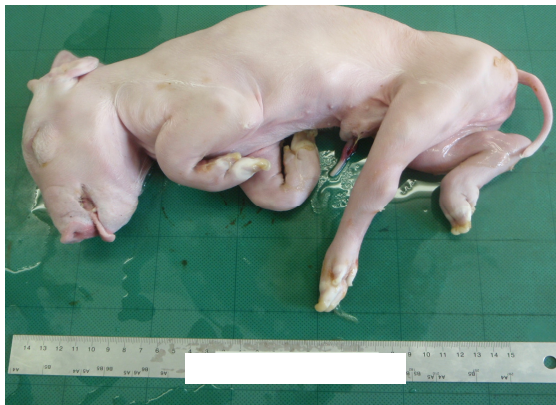


写真3 四肢の奇形 (A-2)



写真4 脊椎の湾曲 (B-2)



写真5 頭蓋の奇形 (B-1)

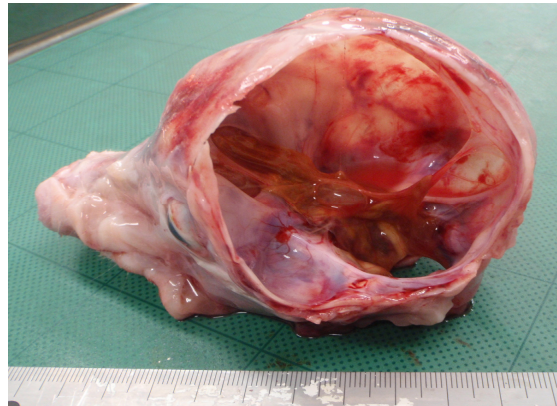


写真6 脳の欠損 (B-1)

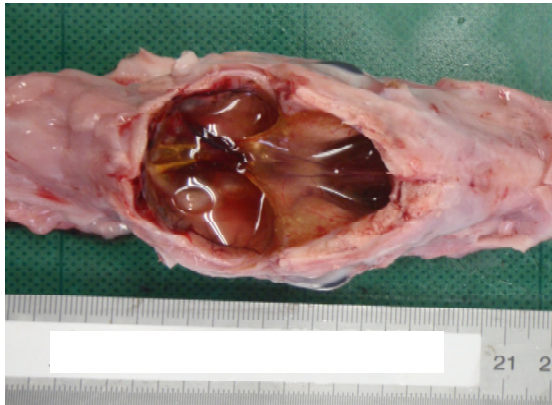


写真7 脳の低形成 (C-①)

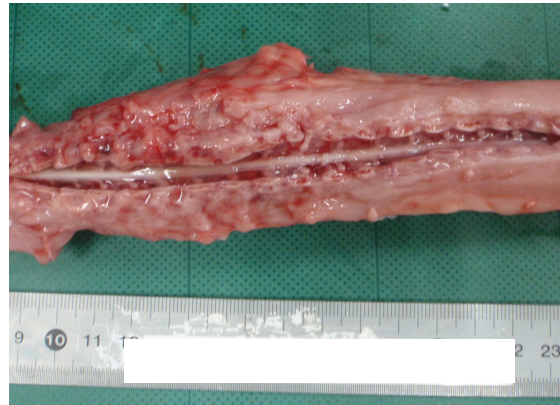


写真8 脊髄の低形成 (B-①)

病理組織学的検査では、中枢神経組織の低形成が確認され、抗 AKV ウサギ免疫血清を用いた免疫組織化学的検査で B 農場の 2 頭 (B-①及び②) の脊髄(写真9) または脳(写真10) の神経細胞において、AKV 抗原が確認された。なお、PCR 検査及びウイルス分離については、全頭陰性であった。

奇形胎子の体液、当該母豚及び同居母豚の血清での豚オーエスキー病、豚コレラ、PRRS、日本脳炎及び豚パルボウイルス感染症の抗体検査では、異常産の原因となる所見が認められなかった。一方、AKV 抗体検査で、当該母豚 5 頭的全頭で抗体の保有が確認された。奇形胎子については、検体番号 A-③の脳脊髄液、B-②及び C-①の胸水及び腹水において抗体の保有が確認された(表2)。これらの分娩 3 症例について AKV の感染が示唆されたことから、AKV 感染に起因する異常産と診断した。また、同居母豚については、12 頭中 10 頭で AKV 抗体を保有しており(図4)、AKV 感染が農場内にまん延していたことが推察された。

追跡豚の AKV 抗体検査については、症例の未発生農場では抗体の陽転が確認されなかったが、発生農場である C 農場では 8 月下旬以降の検査で 2 頭の抗体の陽転が確認された(表3)。このことから、8 月下旬以降に AKV が C 農場に侵入したことが推察された。

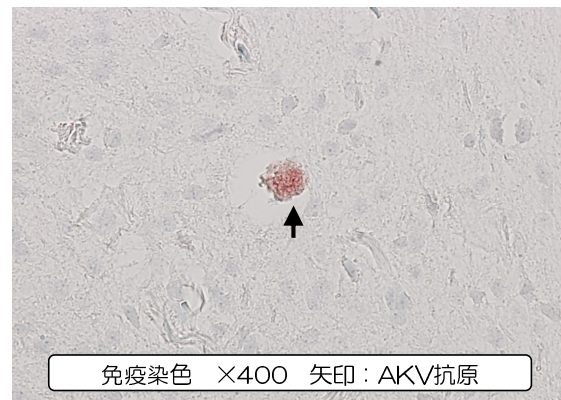


写真9 神経細胞のAKV抗原 (B-① 脊髄)

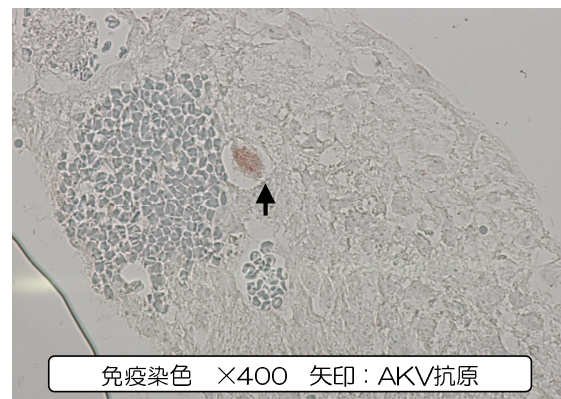


写真10 神経細胞のAKV抗原 (B-② 脳)

表2 異常産症例のAKV抗体検査成績

検体No.	奇形胎子体液			母豚血清
	脳脊髄液	胸水	腹水	
A-①	<2	NT	NT	128
A-②	<2	NT	NT	≥256
A-③	16	NT	NT	64
B-①	<2	<8	NT	≥256
B-②	NT	64	128	
C-①	<2	8	8	32

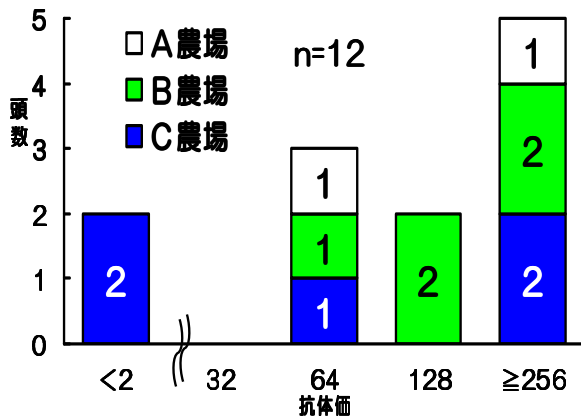


図4 同居母豚のAKV抗体検査成績

表3 追跡豚のAKV抗体検査成績

追跡豚No.	抗体価		AKVの侵入	
	7月下旬	8月下旬	10月上旬	10月下旬
C農場	1	<2	<2	<2
	2	<2	<2	2
	3	<2	<2	4
	4	<2	<2	<2
	5	<2	<2	32
未発生農場	6	<2	<2	<2
	7	<2	2	<2
	8	<2	<2	<2
	9	<2	<2	<2
	10	2	<2	<2

まとめ及び考察

1 豚の病原性について

これまで、2007年の韓国における豚のAKV抗体保有の確認や2008年の佐賀県において、AKV抗体が陽転したおとり牛の周辺で飼養されていた豚にAKV抗体保有¹⁾の事例が報告されており、豚もAKVに感受性を有することが明らかになっている。しかし、豚に対するAKVの病原性については不明であった。今回の症例では、豚の異常産を引き起こす疾病が原因と考えられなかったことから、同時期に牛の生後感染が流行していたAKVの関与を疑い検査を実施した。今回確認されたAKVの豚に対する病原性の発現及び発症豚からのAKV分離については、国内初となる事例と考えられる。養豚経営において、本ウイルスの流行によって生産性が阻害された場合、多大な経済的損失が見込まれる。

2 病性鑑定未実施の症例について

同年11月中旬、C農場の分娩直後の1腹において、哺乳豚3頭の神経症状が確認された。また、発生農場3戸で奇形胎子の娩出を確認した時期に、他の一貫農場2戸において、類似した異常産を確認した。いずれも病性鑑定未実施であるが、発生時期及び聴取した症状等から、AKVの関与が疑われた。

3 ウイルスの動向について

AKV等のアルボウイルス感染症については、国内の常在株が流行を繰り返すのではなく、熱帯・亜熱帯地域からベクターであるヌカカとともに、初夏に発生する季節風（下層ジェット気流）により侵入すると考えられている³⁾。このうち、国内の環境に適応したウイルス株の一部で一過性に広がるパターンが繰り返されると推察されている⁴⁾。本症例の発生農場の位置は、牛飼養農家の密集地域でなく、また、牛の生後感染の発生農場の付近でもなかった。これらのことから、牛と由来を同じくするAKVの感染が、牛の流行と同時に豚へ拡大したことが推察された。

AKVのベクターについては、ウシヌカカをはじめとする数種類のヌカカが知られている³⁾。その吸血については、哺乳動物嗜好性及び鳥類嗜好性に大別され、畜種に関する嗜好性は強くないことが報告されている⁵⁾。今回、豚に媒介したベクターの検証を実施していないため、AKVの侵入経路及び発生経緯については不明である。今後、更なる疫学情報の収集及び分析が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、分離株の系統樹解析ならびに御助言を頂いた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の諸先生方に深謝致します。

参考文献

- 1) 西大輔ら：日獣会誌 64, 540-544 (2011)
- 2) Lim SI et al. : J Vet Sci, 8, 45-49 (2007)
- 3) Yanase T et al. : J Med Entomol, 42, 63-67 (2005)
- 4) Yamakawa M et al : Virus Res, 121, 84-92 (2006)
- 5) 北岡茂男ら：衛生動物, 25, 171-176 (1974)

西農ポークのうまみに関する研究

広島県立西条農業高等学校 畜産科養豚部門

今田 絵梨茄 齋原 夏月 坂本 果穂

○篠原 まるみ 武則 早希 松浦 悠

はじめに

広島県東広島市は、高校や大学が13校もある学園都市である。農業の分野では米の生産から野菜、花そして畜産と幅広く、地域の特産品も多くあるが、東広島市の土地の利用状況を見ると、農地は約12%と少なく、面積の2/3が森林・原野となっている。東広島市の畜産業について調べたところ、総農家戸数のうち畜産農家は1%以下であるが農業産出額は約15%を占め、畜産業が東広島市の農業の大切な分野であることがわかった。これらのデータから、畜産分野の活性化が東広島市の農業全体の活性化につながると考えた。特に畜産分野の中でも養豚経営に注目した。その理由は次の3点である。豚は牛と比べると扱いやすく、短期間で収入を得ることができる生産性の高い家畜であること。猪が家畜化されたことから、農地以外の森林・原野でも飼育が可能であること。そして、豚肉は加工品に向くため、六次産業としての展開が可能であること。

そこで、本校の畜産科では養豚経営を通して、東広島市の農業の活性化を目指して平成19年度より地域資源である酒粕を給与した西農ポークの生産を行っている。また、その豚肉を使用したソーセージ「SAINOポークZ」の製造を行い、地域の方に喜んでいただける商品が完成した。さらに東広島市内の精肉店では、西農ポークの精肉販売もできるようになり、お客様からは豚独特の臭みがなく、脂肪が甘くておいしいと評価していただいている。

研究の目的

私たちが生産する西農ポークのうまみを探るため、人間が肉を食べた時おいしいと感じる感覚を科学的に解析していくことにした。官能検査の項目と成分分析をリンクさせ、今年度は肉のジューシーさを測定する遠心保水性の試験と、肉のうまみ成分の含量を測定する遊離アミノ酸の分析を行うことにした。

試験区の設定

今回の試験では、同時期に2頭の母豚から生まれた22頭の肥育豚を用いて、表1の通り試験区を設定した。なお肥育豚の品種はいずれもLWDの三元豚である。放牧・酒粕区が本校で飼育する西農ポークにあたる。

【表1 試験区の設定】

試験区	母豚(品種)×雄豚(品種)	飼育頭数	酒粕7%添加	放牧飼育
対照区	アズキ × ジャンボ	6頭	×	×
酒粕区	(LW) (D)	6頭	○	×
放牧区	モナカ × ジャンボ	5頭	×	○
放牧・酒粕区	(LW) (D)	5頭	○	○

対照区及び酒粕区は飼育頭数が6頭であるが、試験に用いた豚は6頭のうち無作為に抽出した5頭で行うこととした。

研究1 ～遠心保水性の試験～

肉の保水性は食肉を評価する上で重要な項目であり、保水性の高い肉はジューシーな肉であると言える。試験の方法には、加圧保水性と、遠心保水性があるが、今回の試験は遠心保水性の試験を用いて行うことにした。なお、試験方法は家畜改良センターの理化学試験に準ずる方法で行った。

(1) 準備物

- ・豚肉（ロース肉）
- ・遠心分離器
- ・ファルコンチューブ
- ・電子天秤
- ・包丁
- ・まな板
- ・キムタオル
- ・シャーレ

(2) 試験方法

- ①冷凍したロース肉の中心を2cm分切り出す。
- ②切り出したロース芯を2cmのサイコロ状にする。
- ③冷凍した状態で切り出したロース芯の重量を測定する。
- ④常温で解凍し、排出された肉汁をキムタオルで拭き取り、再度重量を測定する。この時に排出された肉汁を**解凍ドリップ率**とする。
- ⑤肉汁を拭き取ったサイコロ状のロース芯をファルコンチューブに入れ、2500g×10minで遠心分離を行う。なお2500g×10minは人が肉を噛む力と同等である。
- ⑥分離後排出された肉汁を拭き取り、再度重量を測定する。この時に排出された肉汁を**遠心ドリップ率**とする。



①ロース肉のカット



②ロース芯切り出し



③サンプル測定



④解凍し再度測定



⑤遠心分離



⑥サンプル測定とドリップ率の算出

(3) 算出方法

$$\text{解凍ドリップ率 (\%)} = \frac{(\text{解凍前のサンプル重量} - \text{解凍後のサンプル重量})}{\text{解凍前のサンプル重量}} \times 100$$

※解凍ドリップは、解凍したときに出るドリップ量であり、実際に人の口に入らないため数値は低いものが評価は高くなる。

$$\text{遠心ドリップ率 (\%)} = \frac{(\text{遠心前のサンプル重量} - \text{遠心後のサンプル重量})}{\text{遠心前のサンプル重量}} \times 100$$

※遠心ドリップは、人が噛んだときに出るドリップ量であり、肉を食べた時にジューシーだと感じるドリップであるため、数値は高いものが評価は高くなる。

(4) 結果

①解凍ドリップ

【表2 解凍ドリップの測定結果 (平均)】

試験区	サンプル数	解凍前重量 (g)	解凍後重量 (g)	解凍ドリップ率 (%)
対照区	3	16.03	14.83	7.48
酒粕区	3	15.77	13.97	11.45
放牧区	3	15.67	14.00	10.64
放牧・酒粕区	3	15.43	14.47	6.20

②遠心ドリップ

【表3 遠心ドリップの測定結果 (平均)】

試験区	サンプル数	遠心前重量 (g)	遠心後重量 (g)	遠心ドリップ率 (%)
対照区	3	14.83	12.27	17.30
酒粕区	3	13.97	11.53	17.38
放牧区	3	14.00	11.37	18.81
放牧・酒粕区	3	14.47	11.37	21.43

解凍ドリップ率、遠心ドリップ率ともに放牧・酒粕区が最も評価が高くなった。今回の結果では、酒粕区、放牧区ではあまり差は見られないが、組み合わせることによって、西農ポークは解凍したときにドリップが出にくく、噛んだときにドリップが多く出る肉であるといえる。

研究2 ～遊離アミノ酸の分析～

うまみ成分であるグルタミン酸等のアミノ酸の量を測定することによって、人が食べた時においしいと感じる感覚を、具体的に数値で表すことができる。今回は、グルタミン酸量の含量の比較を行った。

(1) 準備物

- ・豚肉（ロース肉） ・アミノ酸分析機
- ・ホモジナイザー ・遠心分離機 ・試験管
- ・マイクロチューブ ・0.22 μmクロマト用フィルター
- ・マイクロピペット ・包丁 ・まな板

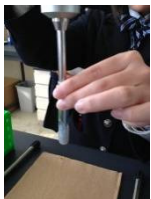


【写真1 アミノ酸分析機 JLC-500/V】

日本電子株式会社 HP より

(2) 前処理

- ① サンプルのロース肉の中心部から 200m g 切り出す。
- ② 切り出した肉を試験管に入れ、除タンパク剤を 200m l 入れてホモジナイズする。
- ③ ②をマイクロチューブに移し、13000 r p mで10分間遠心分離する。
- ④ 遠心後のマイクロチューブの上澄み液を0.22 μ mクロマト用フィルターでろ過する。
- ⑤ ろ過液を分析機に入れる。



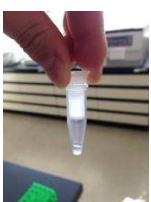
②ホモジナイズ



③マイクロチューブ内のサンプル



④遠心分離したサンプル



⑤ろ過液を分析

(3) 分析結果の補正方法

$$\text{グルタミン酸含量} (\mu \text{g} / \text{m l}) = \frac{\text{グルタミン酸濃度} \times 2}{\text{回収率} \times \text{湿重量}}$$

(4) 結果

試験区	グルタミン酸含量 ($\mu\text{g}/\text{m l}$)
対照区	0.0385
酒粕区	0.0953
放牧区	0.1421
放牧・酒粕区	0.0815

【表4 グルタミン酸含量の測定結果 (平均)】

グルタミン酸含量の測定結果は、表4のようになった。放牧・酒粕区は対照区と比較すると約2倍含まれていることが分かった。また酒粕区の値は約2.5倍、放牧区の値は約3.7倍であった。

考察

遠心保水性の試験の結果から、対照区に比べ放牧・酒粕区の豚肉が保水性が高くジューシーな肉であると考えられる。特に、酒粕区と放牧区では数値が高かったのに対して、組み合わせることで保水性が高くなった。さらに、 $2500\text{g}\times 10\text{min}$ で遠心分離することによって排出された肉汁が、人が噛む力が出るドロップであることから、対照区よりもジューシーな肉であるといえる。

また遊離アミノ酸の分析では、グルタミン酸含量は対照区の値と比較して放牧・酒粕区の値が約2倍となったが、放牧区の値が約3.7倍と最も高くなった。この結果から放牧・酒粕区の値が高くなったのは、放牧飼育の効果であると考えられる。

まとめ

今回の試験の結果から、放牧飼育が豚肉のうまみ成分を向上させる効果があるということがわかった。まだ酒粕添加の効果については、はっきりとは分からなかったが、肉の保水性には影響したと考えた。

今後の課題

右の表5はロース肉で官能検査を行った結果である。肉のやわらかさ、ジューシー感、香りなどの項目を点数化した合計得点と、どちらの肉が好みであるかという割合を示している。

	ロース芯のみ	脂肪付きロース
対照区	63点	39点
(一般的な豚肉)	(54.8%)	(33.9%)
放牧酒粕区	51点	76点
(西農ポーク)	(44.3%)	(66.1%)

【表5 官能検査の結果】

この官能試験の結果からわか

るように赤身の部分だけでは、一般的な豚肉が評価は高くなったが、脂肪を付けた肉で試験を行うと2/3が西農ポークのほうがおいしいと回答したことから、赤身部分の分析以外に、脂肪の分析が必要であるということがわかる。今後は脂肪の融点の違いや、脂肪酸についての分析も行いたい。

また、今回の試験ではアミノ酸分析のサンプル数に上限があったため、各試験区で3つしか試験ができなかったため、サンプル数を増やし再度試験を行いたい。

万能細胞を利用した遺伝子組換え動物作出に向けた研究

広島県立西条農業高等学校

1 年生 ○小笠原 唯衣, 住田 光, 政近 幸穂, 村上 咲, 山下 莉奈

はじめに

本実験はニワトリにおけるキメラ作成技術から遺伝子組換え技術へと進化させることを目標とし、その基礎実験として必要な体外培養法（Perry法）を習得することを目的とした。

現在、胚性幹細胞（ES 細胞）を活用しての人の再生医療の研究が盛んに推進されている。一方、ES 細胞は、実験動物を始め多種類の動物で作成され研究が進められている。万能性を維持した ES 細胞のメリットは、これに外来遺伝子を導入することで、遺伝子改変動物を作成出来ることにあり、新たな技術として有用物質の大量生産系の構築を可能にすると考えられている。

牛や羊といった大中小家畜を用いた研究が盛んに行われてきたが、一頭当たりの維持経費がかかることから小動物（ニワトリやウサギ）の活用にその利用方向の変更が模索されるようになってきている。大量生産を意識すると、多頭羽飼育形態と多産卵という観点から、ニワトリの卵に有用物質を生産させるという方策が急浮上した。そこで、ニワトリ LIF の発見から新規のニワトリ ES 細胞の樹立に成功している広島大学に協力を頂き、この ES 細胞を用いて、多能性維持機構や生殖細胞分化能といった基礎研究分野から ES 細胞へ外来遺伝子を導入して有用な遺伝子改変ニワトリの作出といった応用研究分野まで取り組む計画で実験を進めている。最終目標は、近年猛威をふるっている鳥インフルエンザ耐性を持つニワトリの作出や、全世界にいるだろう卵アレルギーの人々のためにアレルギーを持たない卵を生産するニワトリを創り出すことである。

研究方法

(1) キメラ胚作出技術についての研究について

キメラ (chimera) とは、同一個体内に異なった遺伝情報を持つ細胞が混じっていること。またそのような状態の個体のことである。従ってキメラのニワ

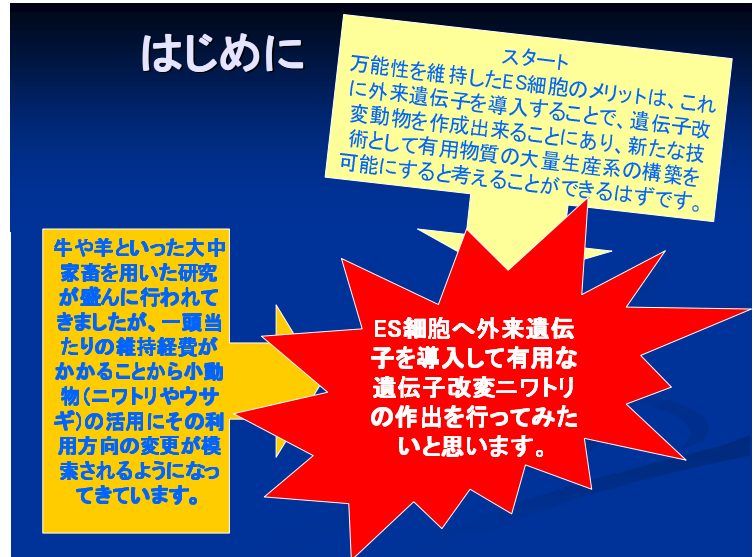


図1 研究の目的

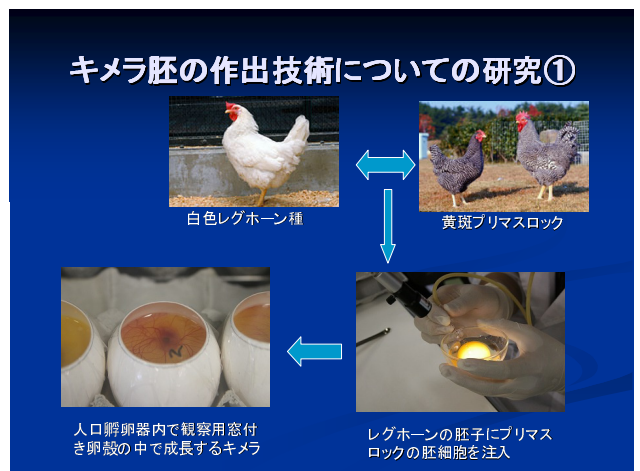


図2 キメラ胚の作出技術

トリを創ると言うことは、羽毛が黒い品種の受精卵の細胞と羽毛が白い品種の受精卵の細胞を混ぜたら、優性形質の色の鳥ができるのではなく、体中バラバラに細胞が散らばっているの黒い羽毛で覆われた部分、白い羽毛で覆われた部分ができるということである。品種が違うがニワトリとアヒルのキメラができないのだろうか。何故なら水禽類は鳥インフルエンザに感染しても発症することがない。この抵抗性をニワトリに導入する方法として、ニワトリと水禽のキメラを作出することができないかと考え、鳥類に於けるキメラ作出技術を取得したいと思い取り組んだ。

まず広島大学で飼育しているニワトリの品種が違うニワトリの受精卵を卵殻から取り出し、ドナーの胚盤胞内部の細胞を培養して、レシピエントの胚盤胞内部に注入する。これが図2右下の写真である。これを用意している卵殻に戻して水溶性卵白で満たして孵卵をすると図2左下の写真のように発生していくこととなる。これがキメラ誕生である。まだ私たちは準備段階であるが、取り組んでいる。

(2) 体外培養法 (Perry 法) の取得

1) システム I から II

キメラニワトリ作成においては受精している卵の卵黄を取り出して、卵殻に戻し再び発生を続けさせる技術が必要である。これが Perry の体外培養法である。この技術 (体外培養法) を取得しなければ研究が進まない。

①卵は卵黄と卵白からできているが、卵白は水溶性卵白と濃厚卵白がある。卵殻を移し替えて成長させていく場合、卵黄をショックアブソーバー的に保護している濃厚卵白やカラザは不必要であり、水溶性卵白だけを多量にとっておく必要がある。図3-2の右のピーカー胚は水溶性卵白である。7人がかりで1時間30分かかり100個の卵から3%作ることができた。



図3-1 水溶性卵白の採取



図3-2 水溶性卵白

②同時進行で「ドナーの細胞が注入されているレシピエントの卵黄」を移し替える卵殻を作っておかなければならない。図4-2はダイヤモンドカッターで市販のL, LLの卵の卵殻の先端部分を削除し中の卵黄や卵白を捨てることとなる。このとき卵殻内部が乾燥しないように図4-3の上部のように伏せて保存しておく。



図4-1 3L卵殻に削除部分をチェック



図4-2 卵殻削除



図4-3 乾燥防止

③まずレシピエントの胚付き卵黄は、濃厚卵白、カラザ、水溶性卵白をすべて取り除く。(図5-1)

ピンセットを使い，卵黄膜を傷つけないよう注意深くやらなければいけない。(図5-2)

*この胚にドナー細胞をマイクロピペットで4000個注入するが，ES細胞の培養技術の項目で詳しく説明する。



図5-1 レシピエント胚作成



図5-2 レシピエント胚作成

④このドナー細胞が注入されたレシピエント卵黄を図4-3の卵殻に図3-2の水溶性卵白を卵殻の1/3程度入れていたものに移植する。



図6-1 システムI作業中



図6-4 ラッピング後固定装置を輪ゴムで止める



図6-2 水溶性卵白注入



図6-5 卵殻削除された卵殻に移し替えられた
レシピエント胚



図6-3 ラッピング前



図6-6 卵殻の固定

⑤次に卵黄が入った卵殻に図3-2の水溶性卵白をあふれんばかりに継ぎ足し、気泡を追い出す。その上に空気が入らないようにラップをかける。卵の発生においては転卵が必要であり卵白・卵黄がこぼれないように図6-5に示す器具で固定しなければならない。



⑥孵卵器に入卵し、温度・湿度を管理していく。図7に示すとおり、卵殻は削除部分を合わせて、隣同士の卵殻を傷つけないよう横向きで卵座に設置する。この状態で3日間孵卵器に入れる。

孵卵温度は37.8~8.0℃、転卵角度は90度、5~15分間隔で転卵した。

図7 卵殻を横にした状態で孵卵

2) Perry法の習得 システムⅢ

⑦入卵72時間後には胚子が大きく成長し、血管が成長していくため卵殻をさらに大きなもの(3L卵殻)に移し替える。(図8-1, 2, 3)



図8-1 すでに血管が走り心臓が動いている



図8-2 ラップを外し3L卵殻に移植



図8-3 72時間孵卵した成長した胚を3L卵殻に移植する方法



⑧再び孵卵を開始し、10日目には大きく成長し心臓も動いている様子が観察できる。

ここまでの試技を覚え、慣れるまでに半年を要すると思われた。今始まったばかりだが「凄いニワトリを作る」までにはまだまだ時間がかかる。

図9 すでに胚は成長しニワトリの身体を形成

3) 1) 2) で使用した器具, 使用方法及び注意点

①卵保定リング

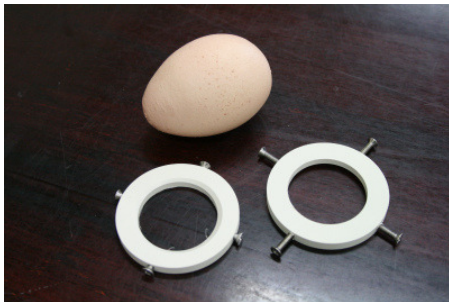


図10 保定リング

システムⅡの卵を固定して孵卵器に入れるための器具である。

②保定リングでの固定



図11 保定リングの固定

システムⅡで鈍端を削除した卵殻に胚付き卵黄を入れ、ラップしたものに保定リングを被せ、輪ゴムで固定する。ラップがずれないように右手で支え、輪ゴムでずれないように固定していく。

③完成したシステムⅡの卵殻



図12 固定完成卵殻

この固定した卵殻は削除してラップで被った面どうしを合わせる形で孵卵器に設置する。卵殻内に空気が入らないよう注意しなければならない。

4) 万能細胞の培養技術についての研究



図 13 ドナー胚処理

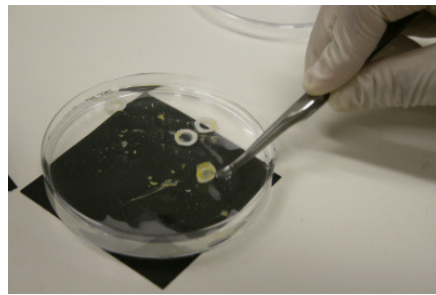


図 18 培養液内で卵黄除去

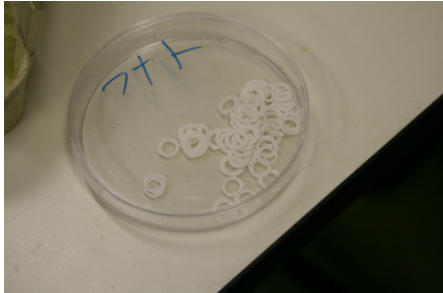


図 14 胚の大きさのリング状の濾紙



図 19 ピペティングで胚盤胞を分離

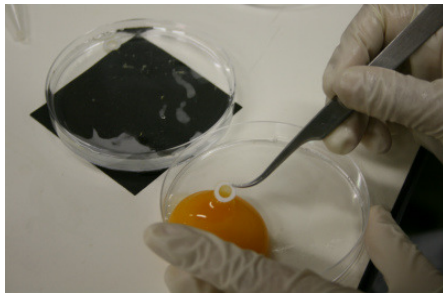


図 15 ドナー胚に押し当てる



図 20 遠心分離で内部細胞塊細胞を単離



図 16 濾紙の周りを切り取る

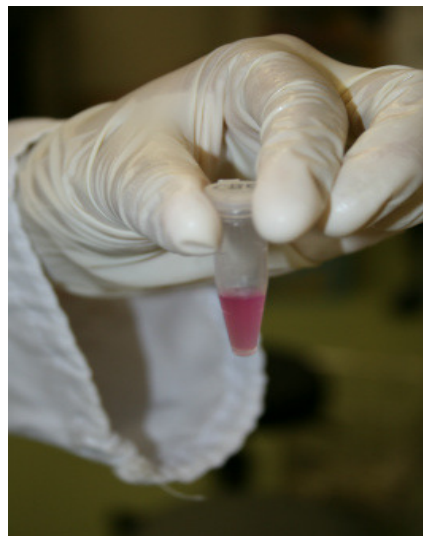


図 21 マイクロチップに保存

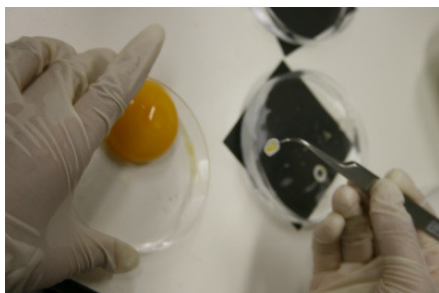


図 17 卵黄をつけないようにはぎ取る



図 22 ドナー細胞の注入



図 23 3L 卵殻への移し替



図 2 4 システムⅢの卵殻を再度孵卵

第 2 段階目は、受精直後の卵から、受精した胚をとりだすことから始める。これはドナーとなる胚盤胞内部の細胞を培養するためである。ニワトリの場合、卵黄・卵白は胚の成長の栄養となるものだが、移植する必要はない。まず卵白・カラザをすべて取り除き、胚子の大きさに切ったリング状の濾紙を乗せて、卵黄膜ごと切り取る。

この切り取られた細胞は新鮮な物であれば、タンパク質分解酵素であるトリプシンなどを使わなくてもピペッティングのやり方次第で細胞をバラバラに分離することができるそうである。さらに遠心分離をしてこのバラバラになった細胞を培養し、品種が違うレシピエント受精卵に入ればキメラ胚が生まれる。

ちなみに 4000 個の胚盤胞内部細胞塊の細胞を注入しなければならない。

これらの練習をして、受精卵の細胞（胚盤胞）を操作しキメラ作製へ一歩近づくこととなる。

器具の使い方、ピペッティング、培養液の作製、受精卵の入手方法など問題が山積みであるが、徐々に実験の形ができあがってきたように感じた。

成績・結果

1) 体外培養法（Perry 法）の取得 システムⅠからⅡ

①ニワトリ胚の体外培養と言うことで、卵殻から卵殻に卵黄を移すことの意義、卵殻内で胚の成長の仕方を理解することができた。濃厚卵白やカラザが残った状態の卵黄を卵殻に移すこと、異動先の卵殻内に再びカラザが発達し、胚が観察できないという不具合が生じた卵が見られた。注意して実験していたつもりであるが経験不足のせいか、反省すべき点があった。

②レシピエント卵黄を卵殻に移動させるのは、卵黄膜が厚いこともあり比較的正確にこなすことができた。移動させた卵殻内の空気を取り除くのは少し難しく、時間がかかった。これも経験不足のところが大きい。

2) 体外培養法（Perry 法）の取得 システムⅢ

①レシピエント卵黄が孵卵 3 日目で心臓が動き、血液も生産していたことが感動的であったが、これを 3 L 卵殻に移し替えることが非常に難しく、卵黄膜を削除した卵殻周縁にひっかけて破ってしまい、卵黄が広がり失敗した。

②ダイヤモンドカッターでの卵殻の削除も丁寧に角が取れるように行わなければいけないことがわかった。

③丁寧に移し替えをやることも大切であるが、思い切りも必要であった。

④個の技術の取得中に気がついたことは、システムⅡからⅢに至るまでに50個/100個、35個/100個、60個/100個、63個/100個と発生率は少しずつ上がっていったが、システムⅢの孵化率は私たちが実施した実験ではほぼ0個であった。夏期休業中の実験であったが、鳥類の発生から考えると実験室内とはいえ春期・秋期の発生率が高いという大学院生からの指摘もあった。

3) 万能細胞の培養技術についての研究

①大学の研究室での実験だけしか経験していないことから、まだ培養技術にまでは至っていない。今後行い予定である。

まとめ及び考察

今回、鳥インフルエンザに対する耐性を持ったニワトリを創ることができれば世の中に貢献できると簡単に考えて取りかかった実験であるが、万能細胞、遺伝子組換え技術は難しく、簡単にはいかなかった。しかしながら広島大学大学院生物圏科学研究科に相談すると、①順を追った実験計画、②実験のスキルを身に付けないと遺伝子(DNA)にかかる実験はできないこと、③遺伝子組換え実験には、施設設備等法律で定められた拘束がある等、を助言いただき、まず万能細胞を使う遺伝子組換えではなく、細胞を注入して行う注入キメラ実験からスタートした。この準備段階の実験においても、スキルの部分でつまづくことも多いが、実験技術を取得しなければすべての実験が机上の空論になることがわかった。本年度10月から本校の畜産農場内の孵卵実験室でPerry法の実験を開始する予定である。前述の結果に示したように体外培養の発生率に季節性があるのか実証試験を考えたい。また本年度中にニワトリ万能細胞の培養に取りかかる準備を進め、現在は体外培養法Perry法の取得を本年度の課題として3年生が1、2年生に指導しながらスキルアップを目指している。

今後の計画

- 1) Perry法に関する技術的に未熟な部分を取り除くために、練習を重ねる。
- 2) キメラ作製で可能な研究について徹底的に調査をする。
- 3) 万能細胞の培養技術についての研究
- 4) 細胞への遺伝子組み換え技術についての研究

私たちに夢は、万能細胞を利用した遺伝子組み換え鶏の作出し、世の中をあっと言わすようなニワトリ(低アレルギーの卵を産むニワトリ、鳥インフルエンザへの抵抗性を持ったニワトリ)を創ることである。一步ずつ着実に取り組みたい。

参考文献

「生命・食・環境のサイエンス」江坂宗春 監修 共立出版

「分子から見た生命の不思議」深宮齋彦 監修 広大生物圏出版会

科学と生物 Vol. 48, No. 4, 2010 ニワトリ万能細胞“ES細胞”とその遺伝子組み換え
堀内恒幸, 有澤謙二郎

飼料イネホールクロップサイレージ給与による肥育試験 Part 3

広島県立庄原実業高等学校 肉用牛経営研究室 ○山王史哉 泉川秀人 中村仁美
上田慈大 竹盛智哉 加藤直美

はじめに

近年、我が国の食料自給率は40%と低い水準を推移しており、特に家畜用の飼料自給率は25%と低い状況が続いている。さらに、福島第一原発事故の影響もあり、食品の安全と安心に対する消費者の関心は一層高まっていることから、畜産業界において消費者ニーズにきめ細かく対応した、食肉生産が強く求められている。そこで、肉用牛経営研究室では、県北地域で増えつつある耕作放棄地を有効利用し、稲作の盛んな庄原地域の特性を生かすとともに、飼料自給率の向上、安心・安全な飼料供給という面から、校内で刈取・調製した飼料イネのホールクロップサイレージ（以下、飼料イネWCS）を活用した、肥育技術マニュアルの作成を目的としたプロジェクトに取り組むこととした。

材料及び方法

1. 調査期間 平成23年2月16日～平成24年12月4日

2. 材 料

(1) 供試牛

平成23年2月16日に開催の三次子牛市場で導入した、黒毛和種肥育牛（去勢）4頭を用い、試験区2頭（No.1, 2）及び対照区2頭（No.3, 4）に区分した。供試牛の詳細は、表1のとおりである。

(2) 飼料イネWCS

品種はクサノホシを用い、校内の圃場で作付け、刈り取りし、WCSとして調製した。成分分析は、従来給与しているチモシーとあわせて、広島県立総合技術研究所畜産技術センターに依頼した（表2）。

表1

No	導入月齢	導入体重 (kg)	父	祖父	曾祖父
1	9.0	319	勝白	福栄	第3神竜の4
2	8.0	298	勝白	平茂勝	安平
3	8.3	316	勝白	福栄	宮島
4	9.2	295	勝白	美津福	平茂勝

表2

項目	粗飼料成分分析				乾物中含有量 (%)	
	DM	粗蛋白	粗脂肪	TDN	NFC	NDF
飼料イネ WCS 完熟期	47.8	4.7	2.5	55.9	37.7	43.9
チモシー1番（出穂）乾草	85.9	10.1	2.8	62.6	14.7	64.8

調査方法

1. 粗飼料給与比較試験

約9～12カ月齢までの肥育前期に、試験区には、粗飼料としてWCSを1日1頭あたり5kg給与、対照区にはチモシーを1日1頭あたり3kg給与し、比較試験を行った。

他の飼料は両区とも同量給与をした。以降は、両区とも従来の肥育方法で飼育した。

2. 調査項目

調査は次の6項目について実施した。

- ①採食量 ②体重変化 (DG) ③血液生化学検査 ④枝肉成績 ⑤生産費比較 ⑥販売利益

成績

1. 採食量

表3は、比較試験中の試験区及び対照区の採食量である。両区ともに採食率80%以上と良く食べており、飼料イネWCSとチモシーの嗜好性に差は認められなかった。

試験区	給与量 (kg)	採食量 (kg)			採食率 (%)
		10	11	12	
試験区	給与量	382	949	1,080	86.6
	採食量	327	797	963	
対照区	給与量	352	828	938	

2. 体重変化 (DG) (図1)

平成24年11月14日の出荷前(約30カ月齢)に実施した測定では、供試牛No.1は806kg、No.2は833kg、No.3は883kg、No.4は763kgであった。調査期間のDGは試験区及び対照区ともに平均0.8kgであった。

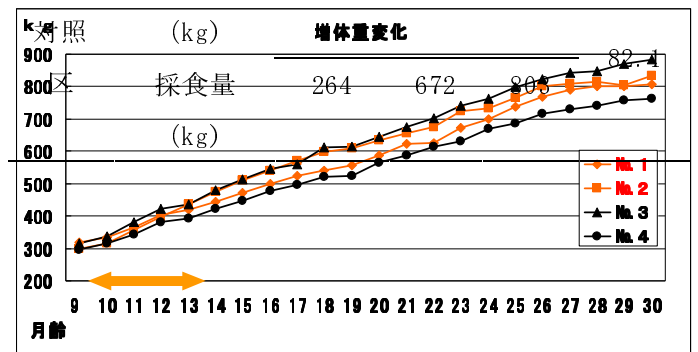


図1

3. 血液生化学検査

(1) 血中VA濃度変化

血中VA濃度変化は図2のとおりである。調査開始時から、試験区及び対照区ともに高値を示した。比較試験終了後は、No.1を除く3頭の供試牛の血中VA値は順調に下降し、約20カ月齢時に最少必要量30IU%dlを示した。No.1は全期を通じて、他の供試牛と比較し、高値で推移した。VA欠乏症予防のため、約20カ月齢以降は随時VAの飲水投与を行った。

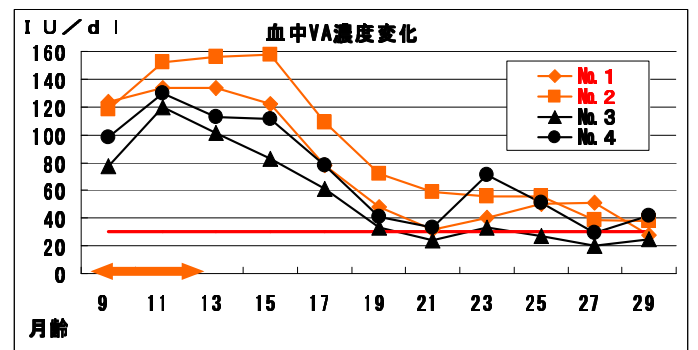


図2

(2) 血中 VE 濃度変化

血中 VE 濃度変化は図 3 のとおりである。11 カ月齢時では、No.1 は 236 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$ 、No.2 は 196 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$ 、No.3 は 263 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$ 、No.4 は 217 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$ であった。17 カ月齢以降は出荷まで、VE 製剤を 1 日 1 頭あたり 10g、飼料に添加したため、高値を示した。

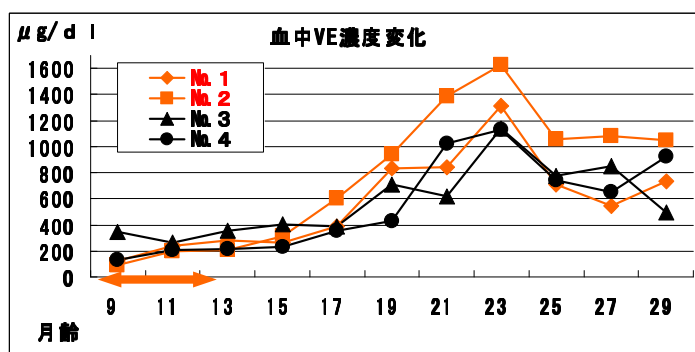


図 3

(3) 血中 T-cho 濃度変化

血中 T-cho 濃度変化は図 4 のとおりである。11 カ月齢時に、No.1 は 97 $\text{mg}/\text{d}\ell$ 、No.2 は 86 $\text{mg}/\text{d}\ell$ 、No.3 は 110 $\text{mg}/\text{d}\ell$ 、No.4 は 85 $\text{mg}/\text{d}\ell$ と低値を示した。17 カ月齢以降は高値で推移し、約 23 カ月齢以降は下降した。

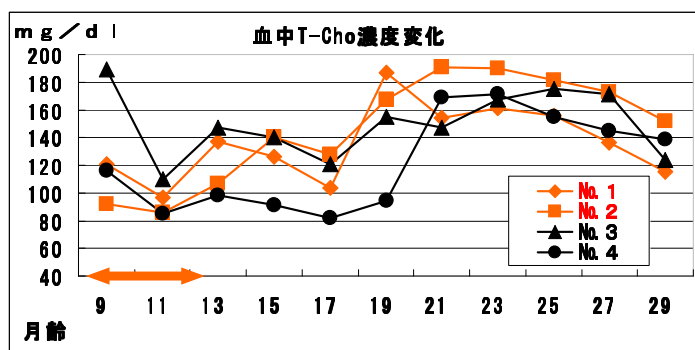


図 4

4. 産肉成績

産肉成績は表 4 のとおりである。試験区 (No.1, 2) の格付は B-4 及び A-4 で、平均値では、枝肉重量 586kg、バラ厚 9cm、ロース芯面積 59 cm^2 、BMS7、BCS3.5、BFS3 であった。対照区 (No.3, 4) の格付は 2 頭とも A-4 で、平均値では、枝肉重量 563kg、バラ厚 9.2cm、ロース芯面積 64 cm^2 、BMS7、BCS3.5、BFS3 であった。

表 4

枝肉成績

No.	出荷時 体重	格付	枝肉重量 (kg)	ロース (C m^2)	バラ (cm)	BMS	BCS	BFS
1	806	B-4	580	63	8.8	8	4	3
2	833	A-4	592	54	9.2	6	3	3
平均	820		586	59	9	7	3.5	3
3	883	A-4	608	62	9.8	7	3	3
4	763	A-4	519	65	8.5	7	4	3
平均	823		563	64	9.2	7	3.5	3

枝肉調査日

No.1, 3, 4 : H24. 11. 22 広島食肉市場
No.2 : H24. 12. 4 広島県畜産共進会

5. 生産費比較

粗飼料給与比較試験期間中に給与した粗飼料の費用を比較した（表 5）。飼料イネ WCS1 kgあたりの生産費は 15.8 円，チモシー1 kgの購入価格は 61 円であった。また，比較試験期間中に試験区で給与した飼料イネ WCS と対照区で給与したチモシーの費用を比較したところ，飼料イネ WCS は 1 頭あたり 5,669 円，チモシーは 1 頭あたり 12,048 円であり，1 頭あたり 6,378 円の差額となった。

表 5 粗飼料費比較

	給与総量 (kg)/頭	粗飼料費 (円)/頭
試験区 (飼料イネ WCS)	359	5669
対照区 (チモシー)	198	12048
差額		6378

※数値は各区の平均値

※粗飼料費の比較は，比較試験期間内のもの

6. 販売利益

表 6 は，枝肉価格および素牛購入から出荷までの飼料費をもとに，販売利益をまとめた表である。配合飼料価格は平成 23 年 2 月と 5 月の価格を使用した。試験区 2 頭あたり 202,672 円の利益となったが，対照区では，No.4 が 189,989 円の損益となったため，67,677 円の損益となった。

表 6 販売利益

No.	出荷 月 齢	素牛購入 価格	飼料価格	素牛+ 飼料費	枝肉価格	利益
1	30.1	501,900	410,624	912,524	957,000	44,476
2	29.5	540,750	419,178	959,928	1,118,124	158,196
						202,672
3	29.9	478,800	420,327	899,127	1,021,440	122,313
4	30.7	589,050	420,327	1,009,377	819,388	-189,989
						-67,677

結果

1. 採食量は，給与量及び残飼量を測定した結果，両区とも良く食べており，差は認められなかった。
2. 体重変化は両区ともに DG は 0.8kg であり，よく増体していた。
3. 血液生化学検査
 - (1) 血中 VA 濃度は調査開始時から両区とも高い値を示した。

(2) 血中 VE 濃度は 11 カ月齢時に No2 が $200 \mu\text{g}/\text{d}\ell$ 以下であったが、月齢が進むにつれて増加し、17 カ月齢以降は、VE 製剤を飼料に添加したため高値で推移した。

(3) 血中 T-cho 値は、両区とも 11 ヶ月齢時に低値を示し、 $100\text{mg}/\text{d}\ell$ 以上を示したのは No3 だけであった。

4. 枝肉成績は両区で大きな差は認められなかった。No4 が BMS8 であったが格付け B-4 という結果となった。

5. 1 頭当たりの生産費は、試験区が対照区より 6,378 円安くなった。

6. 販売利益は、試験区が対照区よりも利益が出た。

考察

飼料イネの嗜好性は高く、価格も安価であり、また自給粗飼料という観点からも安心・安全な飼料と言え、有益な飼料であると考えられる。

VA 値が肥育前期に高い値を示しても、約 20 カ月齢までに最少必要量に近づく飼養管理を行うことで枝肉成績を向上させることが出来た。試験区 No.1 の枝肉成績が B-4 となったことについては、皮下脂肪が 5.0cm と比較的厚かったことがその理由として考えられる。

今後の課題

飼料費が、安価な飼料イネを給与した試験区でさえ、導入から出荷までに 41 万円以上費用がかかっていることから、更なる生産費用の削減が必要である。

今後は、肥育にかかる生産費を抑え、出荷月齢を早めることを第一の目標にかかげ、WCS 給与期間・給与体系を再検討し、現在作成中の WCS 給与マニュアルへ反映させていく。

参考文献

(1) 生産獣医医療システム 肉牛編 社団法人 農山漁村文化協会 2001 年 8 月

花咲く神石高原町・「ミツバチ」から広がる交流・地域活性化

油木高等学校 産業ビジネス科 2年

○松井咲樹 大橋聖子 國岡雅弘

1 はじめに

広島県神石高原町は人口10,862人で、その内高齢者人口が4,584人、高齢化率42.2%であり過疎化・高齢化が進んでいます。基幹産業は、農業ですが高齢化や担い手の減少による農業生産の減少、耕作放棄地の増加と里山は荒廃しています。里山保全のためにも人口減少を食い止め、産業活性化のために選んだのが『ミツバチ』です。「ミツバチ」は「環境指標生物」といわれ、農薬の影響を受ける一番弱い生き物です。ミツバチが飛び交う環境は、安全・安心の証なのです。環境にやさしいミツバチの里として、花を育て里山保全を行うことにしました。

2 研究の目標

- (1) ミツバチの飼育方法を学び、増殖方法を研究する。
- (2) 耕作放棄地の有効活用方法を考案し、里山保全を行いながら観光資源へつなげる取り組みを行う。
- (3) 耕作放棄地を再生、地域へ養蜂業を普及する。
- (4) 東北支援を行う。

3 研究の概要及び結果

(1) ミツバチ増殖方法

ミツバチを導入し、増殖について研究しました。自然に増やすには、働き蜂が新しい女王蜂を誕生させ、今までの女王蜂は半分の働き蜂を引き連れて、新しい群を作ります。これを分蜂といい、計画的に行うことで増殖できます。巣枠2枚ずつに分け、王台を切り分け、表面をあぶり巣枠に取り付けます。多くの女王蜂が作れ、短時間で多くの働き蜂が生まれました。町は標高が高く、夏でも気温が下がるため、産卵ペースが落ちず、増殖に適しています。年間を通じてのミツバチの飼育マニュアルも作り、飼育技術を復活させることができました。

(2) 耕作放棄地の有効活用方法

ミツバチのために花は欠かせません。花が咲けば景観もよくなり、花を見るために訪れる人を呼び込むこともできます。蜂蜜がたくさん収穫できるレンゲを選び、種まきからイベントで行い、労働力の確保と耕作放棄地の再生を目標に行いました。実際に行った、レンゲ種まき祭りには、0歳から76歳の方まで多くの方が参加してくださり、大盛況、農作業もレジャーになることがわかりました。種をまけば、花が見たくなり、神石高原町が気になります。イベントに参加していただいた方に感謝状を送り、神石高原町のサポーターになっていただく活動になりました。このアイデアを地元ホテルの協力により、「観光甲子園」に応募したところ、グランプリ・観光庁長官賞を得ることができました。実際に行うことが決まり、高校から蜂蜜の提供とイベントのサポートを行い、現在100名の方が参加してくだり、町内外の方の交流の場を作るとともに、

観光業の活性化にもなりました。

(3) 耕作放棄地を再生，地域へ養蜂業を普及

私たちの活動を知り，永野南村から耕作放棄地を花畑に変えたいと依頼がありました。その広さ，なんと5ha。20年以上放置され，木々が生えている状態でしたが，草を刈り，木を倒し，株を撤去し，土を耕して，レンゲの種をまき，花畑を作ることに成功したのです。遠くから眺めていた地域の方も私たちの奮闘する姿を見て，何かしなくてはと思ってくださり，3件の家でミツバチの飼育をはじめられ，高齢者の生きがい作りにも貢献できました。この活動は，町議会で耕作放棄地対策として有効であることが認められ，町内の耕作放棄地にレンゲを植える場合，種代は町の予算で購入することが決まり，町全体へレンゲ畑を広げる活動になりました。この取り組みは地域活性化活動を競う「ごほんDE笑顔プロジェクト選手権」で発表しました。5haの耕作放棄地を耕し，養蜂を広めていることが高評価を得て，宮城県での全国大会に出場し，準優勝に選ばれました。

(4) 東北支援

大会後，被災地を訪問し，その被害の大きさに驚きました。遠く離れた私たちができることを考えていた時，宮城県亘理町のイチゴ畑が被害を受けたことを知りました。「知識や技術は人から人へ伝えれば永久の財産になるのだよ」と地元の方から教えてもらったことを思い出し，学校で学んだミツバチの飼育技術を伝えることで少しでもお役に立てないかと考えました。イチゴ栽培でミツバチは花粉交配用として必要ですが，生物でありながら花粉交配用のミツバチは農業資材として販売され，花粉交配時期が終われば，焼却処分されます。イチゴ農家へミツバチを代替させ永久に使用できる技術を伝えることで，経費削減ができ，ミツバチも大切にしてもらえます。しかし，この活動には多大なお金が必要です。そこで地元養蜂家さんへ手伝いに行き，蜂蜜をいただき，販売し活動資金にすることにしました。また，私たちの活動を知り，地元ラジオや卒業生など多くの方が協力を申し出てくださり，活動資金は100万円になり，ミツバチをイチゴの交配時期の秋までに増殖させることができました。今まではミツバチを500箱，つまり1500万円のお金が必要でしたが，今年からは広島から宮城へ旅立ったミツバチが基礎となり，年々増殖して，購入ミツバチ「ゼロ」をめざします。

10月4日，ミツバチを運ぶ冷蔵車と油木高校OBの地域の方6名が来てくださいました。ミツバチは車の振動で巣箱の中を動き回ります。すると巣箱の温度が40度にもなり蒸され，死んでしまいます。これを蒸殺と言い，最悪，全滅します。それを避けるために温度を15度に保つことができる冷蔵車を使うことになりました。10月5日，多くの方の協力により，1100kmの長旅をへてミツバチをイチゴ農家さんへ届けることができました。ミツバチはどの箱も全滅することなく，無事に宮城へ来ることができました。10月6日，ミツバチを受け取ってくださったイチゴ農家さんを亘理町役場の土生さんに案内していただき，ミツバチの様子を見ました。ミツバチを大事そうに眺めて下さるイチゴ農家さんを見ると，胸が熱くなりました。

地域の活性化のためにはじめたミツバチ飼育は耕作放棄地を花畑という宝にかえ，そこで活躍するミツバチは，地域を飛び越え新たな東北支援活動になりました。私たちの学校は町内唯一の高校ですが，高齢化が進み，生徒数も激減していますが，「高校は町の宝」として町の予算で元気ある高校生活を援助していただいています。この活動を通して地域の方へ少しでも恩返しがしたいです。そして，地元だけでなく東北支援を

通じて、少しでも日本の農業が元気になるため、活動を続けていきます。

4. 今後の課題

- ・耕作放棄地を利用した花畑が地域に広がるために、さらに啓発活動を行い、花畑を拡大していきたいと考える。
- ・里山保全のためにも斜面を有効活用し、蜜源植物を育てる活動を行いたい。

参考文献

新特産シリーズミツバチ飼育・生産の実際と蜜原植物

ミツバチの不足と日本農業のこれから

肉用鶏農場における伝染性喉頭気管炎の発生事例

東部畜産事務所

○部屋智子 佐々木栄美子

はじめに

伝染性喉頭気管炎（以下 ILT）は、呼吸器症状を呈する鶏の届出伝染病であり、ヘルペスウイルス科に属する ILT ウイルスによって引き起こされる。鶏群での伝播速度は比較的遅いが、一度農場内に ILT ウイルスが侵入すると常在化するため、清浄化まで長い期間を要する¹⁾。平成 24 年 6 月、管内の肉用鶏農場において、広島県で 13 年ぶりとなる ILT の発生が認められたので、その概要を報告する。

発生概要

1. 発生農場の概要

149,000 羽を飼養する肉用鶏農場で、開放式平飼鶏舎（以下 A 鶏舎）12 棟及び無窓式平飼鶏舎（以下 B 鶏舎）の各 12 棟が配置され、1 鶏舎あたり 6,000～7,000 羽飼養していた。農場入口は一ヶ所に消毒ゲートが設置され、手前から B 鶏舎、A 鶏舎の順に配置されていた。また、鶏舎毎に、0 日齢で導入し 45～55 日齢で出荷している。（図 1）

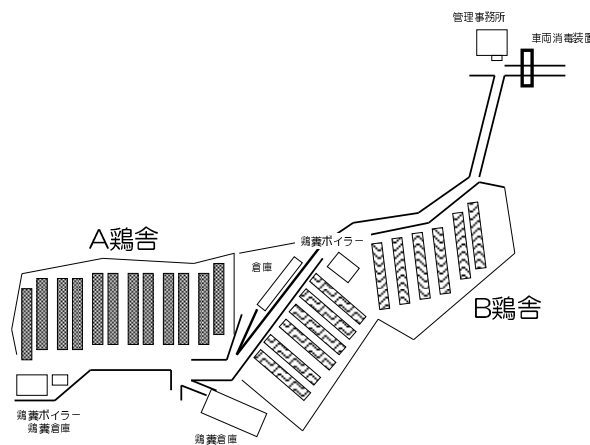


図1 農場配置図

2. 発生状況

平成 24 年 6 月 3 日、開放式鶏舎 1 棟（A2, 48 日齢, 雌）で、元気消失、奇声（猫の鳴き声に似た、枯れた鳴き声）を上げ、死亡羽数が増加。6 月 5 日、死亡羽数が過去 21 日の平均死亡羽数の 3 倍となり、鶏舎内に死亡鶏が散見された。6 月 13 日、他の A 鶏舎 3 棟で、6 月 15 日、B 鶏舎 1 棟で同様の症例を確認。以降、初発から約 1 ヶ月の間に、ほぼ全ての鶏舎で同様の症状を認めた。

発生時、農場内には異なる日齢の鶏が飼養されていたが、死亡は 35 日齢以上で大半を占めた。また、雄、雌の飼養羽数は、ほぼ同数であったが、雄に比べ雌の死亡羽数が 2.5 倍となった。なお、A 鶏舎及び B 鶏舎の飼養羽数はほぼ同数であったが、無窓鶏舎である B 鶏舎が A 鶏舎に比べ約 2 倍近い死亡羽数となった（図 2, 3）。

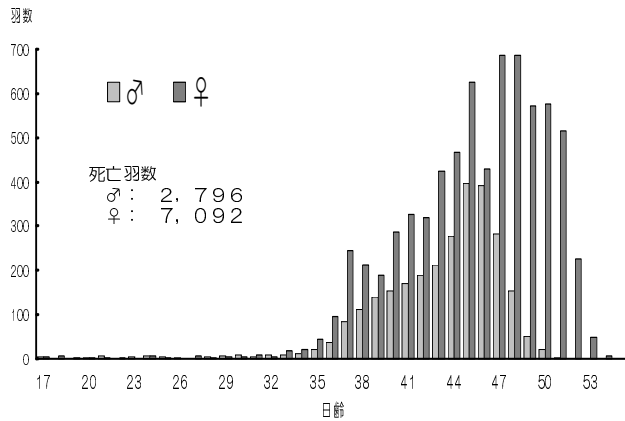


図2 日齢別 死亡羽数 (性別)

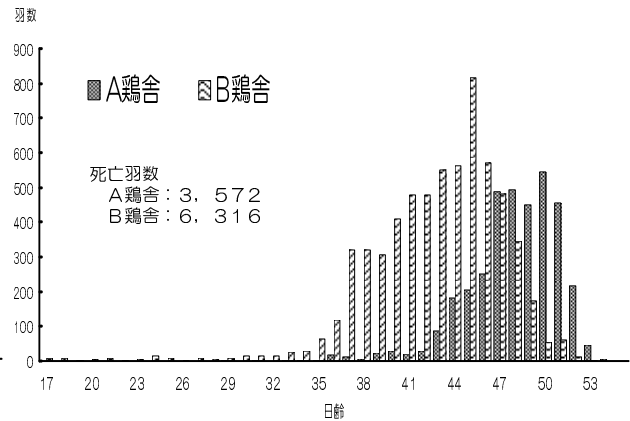


図3 日齢別 死亡羽数 (鶏舎別)

3. 疫学情報

ワクチンプログラムは、14日齢に伝染性ファブリキウス嚢病及びニューカッスル病のワクチンを飲水投与していた。

材料

平成24年6月5日に採材の生鶏3羽(48日齢)、6月19日に採材の生鶏4羽(41, 58日齢)及び7月2日に採材の死亡鶏6羽(38, 41, 44日齢)を検査材料とした。

方法

1. 病理学的検査

主要臓器を20%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従いパラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色(H・E染色)を行った。また、迅速診断法として、気管粘膜塗抹標本をGendre液で固定しH・E染色を行った。

2. 細菌学的検査

脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、肺の乳剤を5%羊血液加寒天培地、DHL寒天培地を用いて培養を行った。培養条件は、5%羊血液加寒天培地で37°C, 24時間、好気培養、DHL寒天培地で37°C, 48時間、嫌気培養とした。

3. ウイルス学的検査

気管および肺の乳剤は、PCR法によりILTウイルス遺伝子の検出を行った。また、気管、肺及び腎臓は10%乳剤を作成し、初代鶏腎(CK)細胞及び発育鶏卵に接種してウイルス分離を行った。分離ウイルスについては、ILT標的遺伝子(TK, TKII, ICP4)をPCR法で増幅し、それぞれを3種類の制限酵素(*Msp* I, *Hae* III, *Hha* I)で切断した断片長をワクチン株と比較する、制限断片長多型(RFLP)解析を行った。インフルエンザウイルスについては、気管スワブを用いて、ニワトリ用インフルエンザ迅速診断キット(エスプラインAインフルエンザ, 富士レビオ株)により抗原の検出を行った。

成績

1. 病理解剖学的所見

全検体で外貌に異常を認めなかった。剖検所見では気管内出血 (13/13 羽), 気管内血様滲出物貯留 (13/13 羽), 喉頭内粘液増量 (1/13 羽) を認めた (図 4)。

2. 病理組織学的所見

肺の二次気管支から旁気管支内には, 粘膜上皮細胞の合胞体及び核内封入体の形成が認められ, 気管支腔内には剥離した合胞体, 上皮細胞, マクロファージ, 偽好酸球及び出血を認めた (12/13 羽) (図 5)。

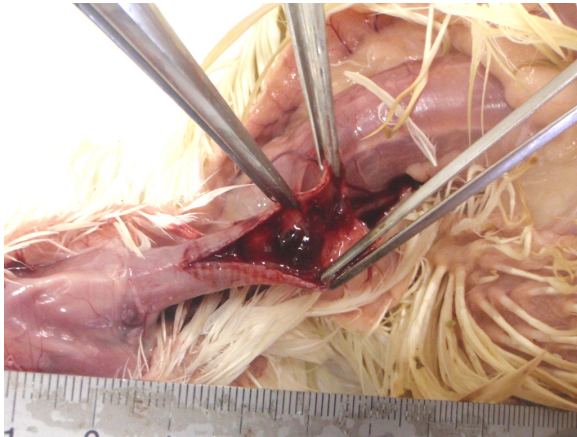


図4 気管内血様滲出物貯留

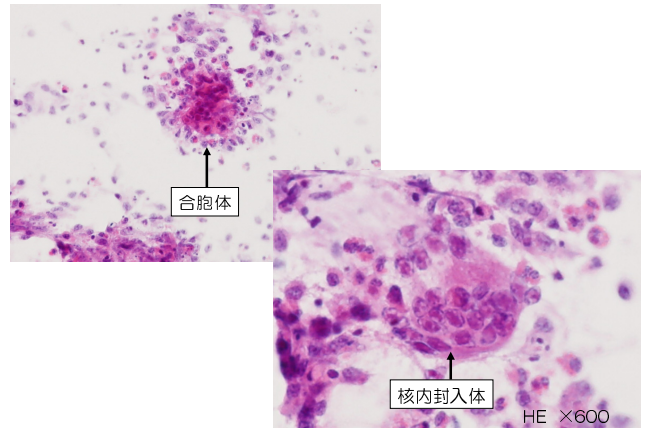


図5 気管支の粘膜上皮細胞

3. 細菌学的検査

全羽で有意菌は認められなかった。

4. ウイルス学的検査

PCR 法による ILT ウイルス遺伝子の検出については, 気管で 7 羽中 6 羽, 肺で 3 羽中 2 羽が陽性であった。気管及び肺の乳剤を接種した CK 細胞において 7 羽中 3 羽でシンシチウム形成を伴う細胞変性効果を認めた。培養上清を用いた PCR で, 分離ウイルスを ILT ウイルスと同定した。また, 発育鶏卵には気管の乳剤を接種したが, 分離は全羽陰性であった (表 1)。検体 4 の気管から分離されたウイルスを RFLP 解析したところ, 検索した全ての標的遺伝子の RFLP パターンが既存のワクチン株とは一致しなかったため, 今回分離された ILT ウイルスは野外株と診断した (表 2)。また, インフルエンザ迅速診断キットは, 全羽陰性であった。

表1 病性鑑定結果

検体 No.	病理組織学的検査			ウイルス学的検査		
	合胞体, 核内封入体			PCR		ウイルス分離
	肺	喉頭, 気管	鼻腔	肺	気管	気管, 肺
1	+	-	+	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	ND	+	+
5	+	+	+	ND	+	+
6	-	+	+	ND	-	-
7	+	-	+	ND	+	+

表2 制限酵素断片長多型解析結果

材料：検体No.4の気管由来のウイルス

標的遺伝子	制限酵素	分離ウイルス	ワクチン株				標準株
			CE	エルティパックス	SPL	C7	
TK	Msp I	A	A	A	B	B	B
	Hae III	A	A	A	B	B	B
	Hha I	A	A	A	A	A	A
TKII	Msp I	A	A	A	B	B	B
	Hae III	A	A	A	B	B	B
	Hha I	A	A	A	A	A	A
ICP4	Msp I	A	C	C	B	A	A
	Hae III	A	A	A	B	C	C
	Hha I	A	A	A	B	C	D

防疫対策及び衛生指導

1. 場内消毒

ILT 発生後、緊急消毒として場内の敷地に石灰散布を行った。鶏舎周囲及び空気口は、逆性石けんを用いて消毒を行った。特に排気口周辺の消毒を重点的に行い、塵芥除去を徹底した。鶏体消毒は、休薬期間のないヨード系消毒薬を用いて毎日実施した。飲水は、水道水を貯留するタンクに塩素を添加し、二次感染の予防を行った。車両消毒については、消毒ゲートで使用する逆性石けんの濃度を計量して正確に調整し、また噴霧水量を消毒液が車体全体にかかるように設定を行った。

出荷後の鶏舎消毒については、敷料を含めて徹底的に除糞し、入雛までに苛性ソーダ、逆性石けん、ヨード系消毒薬、消石灰、ゾール剤、アルデヒド系消毒薬を用法上の最高濃度で散布した。また、ILT 発生前は床のみを消毒していたが、発生後からは壁も床と同様の消毒を実施した。

鶏糞及び敷料の処理は、発生前は堆肥舎に集積後ボイラーで焼却していたが、発生後は鶏舎内で消石灰を混合し逆性石けんを噴霧した後に堆肥舎へ移送し、堆肥舎で消石灰を再度混合のうえ、ブルーシートで被覆し順次ボイラーで焼却した（図 6, 7）。

- 車両消毒：消毒ゲートの調整
- 出荷後鶏舎消毒：
 - 除糞 → 苛性ソーダ → 乾燥 → 逆性石けん
 - ヨード系消毒薬 → 乾燥 → 消石灰 → ゾール剤
 - アルデヒド系消毒薬 → 入雛

図6 場内消毒

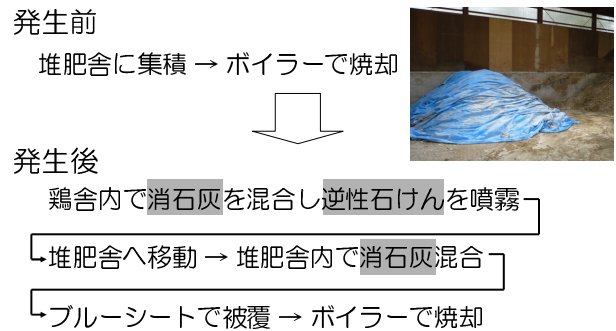


図7 鶏糞処理

2. 飼養管理

発生前は2名の管理者が全鶏舎を管理していた。各鶏舎専用の長靴は設置していたが、衣服の交換はしていなかった。発生後は管理者を4名に増員し管理鶏舎を固定化、各鶏舎専用の長靴と服を設置し、鶏舎入口には逆性石けん、ゾール剤及び消石灰の3種類の踏込み消毒槽を設置した。

死亡鶏の処理は、発生前はサービスルームに集積し出荷トラックで運搬していたが、発生後は農場専用の金属箱に詰め消毒をした後、箱ごと処理会社のトラックへ載せて処理場へ運搬する形とした。

3. 出荷

臨床症状を認めた鶏の早期淘汰を実施し、食鳥処理場へのお荷にあたっては、健康確認を徹底した。鶏舎内での鶏体への消毒は毎日実施したが、出荷時にも出荷用ケージの上から噴霧消毒を行った。

食鳥処理場において他のプロイラー農家への感染拡大防止対策として、農場専用ケージの使用、他農場のトラックが退場後に当該農場が搬入し、食鳥処理作業終了後には、処理場敷地内の消毒の徹底を行った。

まとめ

ILT 感染鶏は、発症中に気管内滲出物が大量に排出する時期があり、この時期に滲出物を気管から排泄できなければ滲出物が気道を塞いで窒息死する²⁾。今回、雌雄で死亡羽数に差が出たのは、筋肉量の少ない雌が滲出物を十分に排泄できずに窒息し、死亡したと考えられた。飼養形態での死亡率の差は、無窓鶏舎である B 鶏舎は A 鶏舎に比べて気密性が高いため、一度侵入を許すと鶏舎内でウイルスがまん延しやすい環境であったためと考えられた。

ILT 対策後、新たに導入したロットでは ILT の発生は認めていない。これは、鶏舎の床等に出来たひび割れに入り込んだ敷料等も徹底的に洗浄し、更に数種類の消毒薬で消毒、その後石灰で封じ込めを行ったため、環境中に残存する ILT ウイルスの撲滅が図れたと考えられた。

また、通常、ILT は冬季に発生するが、今回は発生が 6 月であったため、気候的にも早期終息が可能であったと考えられた。

通常、一度 ILT が発生した農場ではウイルスが常在化しやすく、清浄化までかなりの期間を要する。しかし今回、ワクチンを使用せず終息できた事、また他農場へのまん延防止が図られた事は、農場での定期的な消毒及び衛生管理の徹底が、効果的であったと思われる。飼養衛生管理基準を遵守し、これを維持する事が重要であると考えられた。

謝辞

最後に、制限断片長多型解析検査にご協力頂いた財団法人化学及血清療法研究所の諸先生方に深謝致します。

参考文献

- 1) 鳥の病気，鶏病研究会編，第 6 版（2006）
- 2) 山田 進二 鶏のワクチン 改訂，木香書房，1992 年

広島県内で発生した伝染性喉頭気管炎

西部畜産事務所

○藤田敦子 桑山 勝

はじめに

伝染性喉頭気管炎（ILT）は、ヘルペスウイルスによって引き起こされる奇声や血痰排出を特徴とする鶏の呼吸器病である。県内では、平成 11 年以降発生は認められていなかったが、平成 24 年 5 月から 6 月にかけて 2 戸の養鶏場で ILT の発生が確認された。

当所病性鑑定課で ILT の診断を実施し、迅速かつ確実な診断をするための検査法の検討を行ったので、その概要を報告する。

方法

1. 発生概要

1) A 農場：高床式無窓鶏舎で、採卵鶏（ジュリア及びジュリアライト）を 182,000 羽飼養。大雛導入しており、ILT ワクチンを導入元で約 20 日齢及び約 65 日齢にスプレー方式で接種していた。5 月下旬～6 月中旬に死亡鶏の増加及び奇声が認められたため、病性鑑定を実施した。

2) B 農場：平飼い無窓及び開放鶏舎で、肉用鶏（チャンキー）を最大 149,000 羽飼養。6 月上旬～中旬に死亡鶏の増加及び奇声が認められたため、病性鑑定を実施した。

2. 材料

1) No. 1～4：A 農場 1 例目，5 月 30 日病性鑑定，138/141 日齢，雌

2) No. 5：A 農場 2 例目，6 月 14 日病性鑑定，615 日齢，雌

3) No. 6～8：B 農場 1 例目，6 月 5 日病性鑑定，48 日齢，雌

4) No. 9～12：B 農場 2 例目，6 月 19 日病性鑑定，41/58 日齢，雌

両農場については、この他にも病性鑑定を実施したが、今回、最終的に ILT と診断した 12 羽について、詳細な検索を実施した。なお、当所で病理解剖を実施した No. 1～5 及び No. 9～12 については、搬入時には死亡した状態であった。

3. 病理学的検査

病理解剖を実施し、ホルマリン固定臓器から常法により病理組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施し、鏡検した。

No. 5，9～12 については、病理解剖時に気管の生材料を 2 cm 程度採取し、気管粘膜塗抹検査を実施した。塗抹検査は、小田切ら¹⁾の方法に従い、気管を半分に切開して粘膜を搔き取り、スライドガラス 2 枚で挟んで薄く塗抹した後、標本が生乾きのうちに Gendre 液で固定し、HE 染色して鏡検した。

気管粘膜塗抹検査及び病理組織学的検査では、ILT 病変として、合胞体形成のみが認められたものを±、合胞体形成及び核内封入体の両方が認められたものを+～+++で表し、+以上を ILT 陽性と判定した。

4. ウイルス学的検査

1) 分離

No. 1～12 の気管, No. 6～8 の肺, No. 1～4, 6～8 の腎臓の乳剤を発育鶏卵に接種し, No. 5, 9～12 の気管及び肺, No. 9～12 の腎臓の乳剤を初代鶏腎 (CK) 細胞に接種し, 1～2 代培養を行った。

2) 遺伝子検査

No. 1～12 の気管及び No. 6～8 の肺の乳剤について, 鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス (ILTV) の PCR 法を実施した。また, No. 1 及び 9 の気管から分離されたウイルス株について, 財団法人化学及血清療法研究所に依頼し, 制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析を実施した。

5.細菌学的検査

No. 1～8 の肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺及び脳と No. 1～5 の消化管について, 細菌分離を常法に従い実施した。

成績

ILT と診断した 12 羽の病理学的検査成績を表 1 に示した。病理解剖学的検査で, No.11 を除く 11 羽の気管に黄白色の膿状物, 偽膜様物, 血様滲出物の付着や貯留が認められた (図 1)。また, 肺の一次気管支及び二次気管支などの太い気管支にも黄白色～血様の滲出物の貯留が認められ (図 2), 咽喉頭や鼻腔には粘液貯留なども認められた。

気管粘膜塗抹検査では, 検査した 5 羽のうち, No. 5, 9, 10 及び 12 に粘膜上皮細胞の合胞体形成が認められ, No. 5 及び 12 にはその中に核内封入体が確認された (図 3)。

病理組織検査では, 全羽において, 喉頭, 気管, 肺, 結膜または鼻腔のいずれかの部位に, 粘膜上皮細胞の合胞体形成と CowdryA 型またはフルタイプの核内封入体を伴う出血性化膿性の炎症反応が認められた (図 4, 図 5)。

B 農場の喉頭及び気管では, 粘膜上皮細胞の剥離, 脱落と, 気管内腔への偽好酸球等の炎症性細胞の浸潤がみられたが, 核内封入体は認められないものが多く, 粘膜上皮細胞の重層化を伴う再生像も認められた (図 6)。

今回, 気嚢には病変は観察されなかった。

また, その他の病変として, No. 4 の主要臓器にリンパ球様細胞の浸潤や腫瘍性増殖がみられ, No. 6～12 のファブリキウス嚢にリンパ球の脱落が認められた。

ウイルス学的検査では, ILTV の遺伝子検査 (PCR 法) で, No.11 以外の 11 羽の気管及び No.

表 1 病理学的検査成績 (ILT病変)

農場	No.	肉眼所見 塗抹検査		病理組織所見				
		気管	気管	結膜	鼻腔	喉頭	気管	肺
A農場 (1例目)	1	+	NT	-	±	+++	+++	-
	2	+	NT	-	-	+++	+++	+++
	3	+	NT	-	±	±	±	-
	4	+	NT	++	++	++	+++	-
A農場(2例目)	5	+	+	-	-	±	+	±
B農場 (1例目)	6	+	NT	+++	+	-※	-※	+++
	7	+	NT	-	++	-※	-※	+++
	8	+	NT	++	+	-※	-※	+++
B農場 (2例目)	9	+	±	+++	±	-※	±	+++
	10	+	±	±	±	+	++	+++
	11	-	-	+++	+++	+	-	-
	12	+	++	+++	+++	-※	-※	+++
病変出現率	11/12 (92%)	2/5 (40%)	6/12 (50%)	6/12 (50%)	5/12 (42%)	5/12 (42%)	7/12 (58%)	

+～+++ : 合胞体形成と核内封入体を伴う病変, ± : 合胞体のみ, ※ : 慢性病変あり NT : 検査未実施

表 2 ILTV検査成績まとめ

No.	病理学的検査				ウイルス学的検査			細菌学的検査
	肉眼所見	塗抹検査		病理組織所見	遺伝子検査 (PCR法)		分離 (2代)	
		気管	気管		気管	気管		
1	+	NT	+	+	+	+	NT	-
2	+	NT	+	+	+	+	NT	-
3	+	NT	±	±	+	-	NT	-
4	+	NT	+	+	+	+	NT	-
5	+	+	+	±	+	-	-	-
6	+	NT	-	+	+	-	-	-
7	+	NT	-	+	+	-	-	-
8	+	NT	-	+	+	-	-	-
9	+	±	±	+	+	-	+	NT
10	+	±	+	+	+	-	+	NT
11	-	-	+	+	-	-	-	NT
12	+	+	-	+	+	-	+	NT
ILT 検出率	11/12 (92%)	2/5 (40%)	6/12 (50%)	10/12 (83%)	11/12 (92%)	6/12 (50%)		

6の肺が陽性を示した。ウイルス分離では、No. 1, 2, 4の気管の3検体で発育鶏卵の漿尿膜に不整形なポック形成が確認され、ポックの病理組織学的検査で、合胞体形成と核内封入体が認められた。また、No. 9, 10, 12の気管及び肺の3検体でCK細胞に細胞変性効果が確認された(表2)。

No. 1及びNo. 9の気管から分離されたILTVのRFLPパターンの比較では、今回2農場から分離された株は、どちらも同じパターンを示し、これらの切断パターンは、国内で使用されているワクチン株4株及び野外の強毒株であるNS-175株とは異なっていた(表3)。

細菌学的検査の結果は、全例有意菌分離陰性であった。

まとめ

今回、最終的にILTと診断された12羽のうち、気管の肉眼病変は11/12羽(92%)に認められた。気管粘膜塗抹検査の核内封入体の陽性率は2/5羽(40%)であった(表1)。

病理組織学的検査では、結膜及び鼻腔がそれぞれ6/12羽(50%)、喉頭及び気管がそれぞれ5/12羽(42%)、肺が7/12羽(58%)陽性であり、肺で最も高い陽性率を示した(表1)。また、喉頭及び気管を合わせた陽性率が6/12羽(50%)であったのに対し、結膜、鼻腔及び肺を合わせた陽性率は10/12羽(83%)であり、全ての部位を合わせるとNo. 3以外の11/12羽(92%)で核内封入体が確認された(表2)。

考察

今回の成績では、気管の肉眼所見とILTVPCR法の成績は完全に一致しており、気管の肉眼所見は、ILTの最初の診断として重要であることが確認された。ILTを疑う鶏の病性鑑定を実施する場合には、まず気管粘膜をよく観察して病変の有無を確認し、肉眼所見が認められた場合に気管粘膜塗抹検査を実施すると、早期の診断に役立つと考えられた。気管粘膜塗抹標本は90分程度で作成でき、PCR法よりも早く結果が判明するが、発症後時間が経過すると偽好酸球等の炎症性細胞が増加し、核内封入体の確認が困難となる。そのため、特に発症初期における気管粘膜塗抹検査が有効であると思われる。

No.11については、結膜及び鼻腔の病変は重度であったにもかかわらず、喉頭にはごく一部にしか病変がみられず、気管及び肺にはILTによる病変は認められなかった。ILTの病変は、結膜及び鼻腔からはじまり、喉頭、気管、肺へと進行していると考えられ、No.11については、感染初期で気管に感染が波及していなかったために、ウイルスが検出できなかったと推察された。

B農場の検査結果から、喉頭及び気管においては、病変が比較的早期に慢性化し、核内封入体が消失する傾向が認められた。喉頭及び気管の病変が慢性化した後も、肺や結膜及び鼻腔には核内封入体を含む新しい病変が認められる場合が多かったことから、喉頭及び気管だけでなく、通常観察する肺のほかに、結膜及び鼻腔も合わせて検索すると核内封入体の検出率が上がると考えられた。また、気管からのウイルス分離はごく短い期間に限られる可能性が考えられるため、ウイルス分離材料についても、肺を加えると

表3 ILTV遺伝子のRFLPパターンの比較

遺伝子	制限酵素	分離株		ワクチン株				強毒株
		A農場 No.1	B農場 No.9	A株	B株	C株	D株	
TK	MSP I	A	A	A	A	B	B	B
	Hae III	A	A	A	A	B	B	B
	Hha I	A	A	A	A	A	A	A
TK-II	MSP I	A	A	A	A	B	B	B
	Hae III	A	A	A	A	B	B	B
	Hha I	A	A	A	A	A	A	A
ICP4	MSP I	A	A	C	C	D	B	A
	Hae III	A	A	A	A	C	B	B
	Hha I	A	A	A	A	C	B	D

A~Dはそれぞれ異なるRFLPパターンを示す

もに、採材時に二次気管支を含む部分が入るよう大きめに採材すると分離率が上がる可能性があると思われた。

A 農場においては、結膜や鼻腔の核内封入体検出率が B 農場よりも低く、病変が比較的軽度であった。これについては、A 農場において、スプレー方式ではあるが、2回ワクチンを接種されていたため、侵入門戸の局所免疫がある程度成立していたためではないかと推察された。

しかし、今回、ワクチンを2回接種していたにもかかわらず、発症鶏が認められたため、スプレー方式では、2回接種しても発症を完全に防御する効果がなかったものと推察された。当該鶏の導入元農場で使用されていた ILTV 生ワクチンの用法は、点眼または点鼻投与することとされているため、用法用量を守ってワクチン接種することが、十分なワクチンの効果を得るためには重要であると考えられた。

今回両農場の鶏から分離された ILTV は、RFLP で同一の切断パターンを示し、国内で使用されているワクチン株4株とは異なる切断パターンであった。このことから、今回の発生の原因となった ILTV は、鶏や器具機材、人等の何らかのものを介して外部から持ち込まれたものと考えられた。

両農場とも、今回の感染経路を特定することはできなかったが、飼養衛生管理基準の遵守とワクチンの適正使用による疾病予防対策により、ILT の新たな発生は防げると考えられた。

最後に RFLP 解析を実施していただいた財団法人化学及血清療法研究所の永井先生に深謝する。

参考文献

- 1) 小田切美晴, 望月宏, 合田光昭: 伝染性喉頭気管炎の塗抹による迅速診断法, 鶏病研究会報, 第 17 巻 3 号, 161-166 (1981)

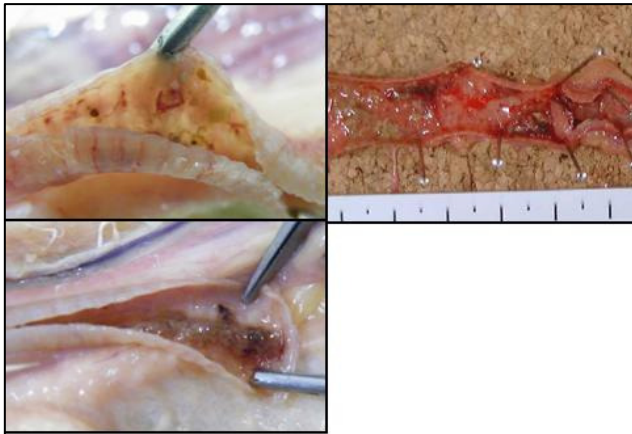


图 1 气管 (A農場)

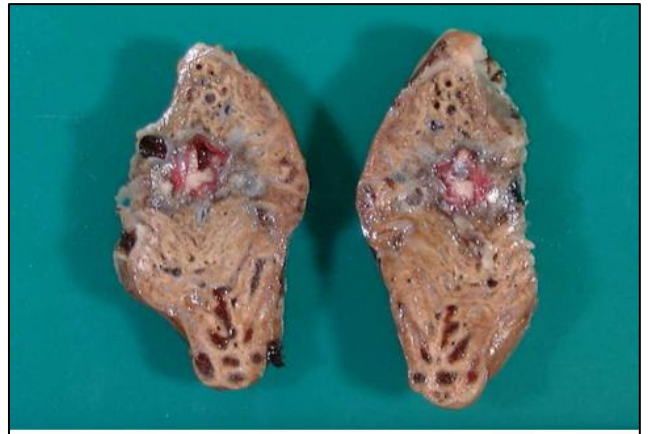


图 2 肺 (No. 7)

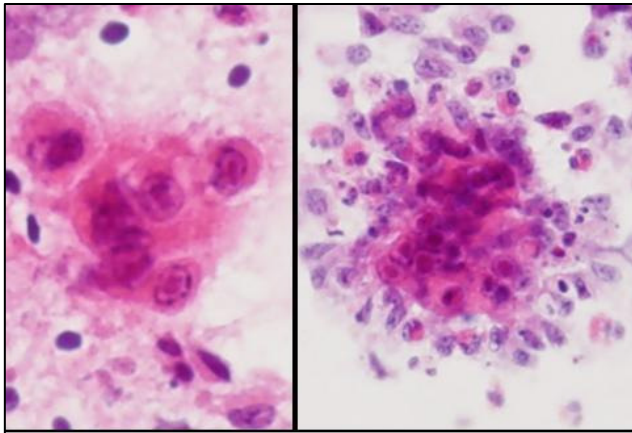


图 3 气管粘膜塗抹標本 (左:No. 5, 右:No. 12)

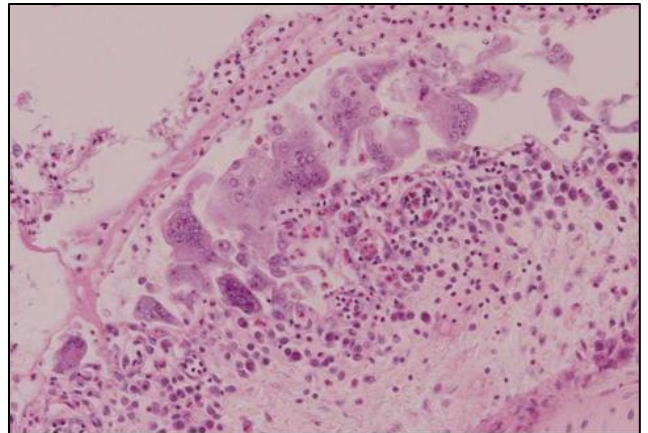


图 4 气管 (No. 1)

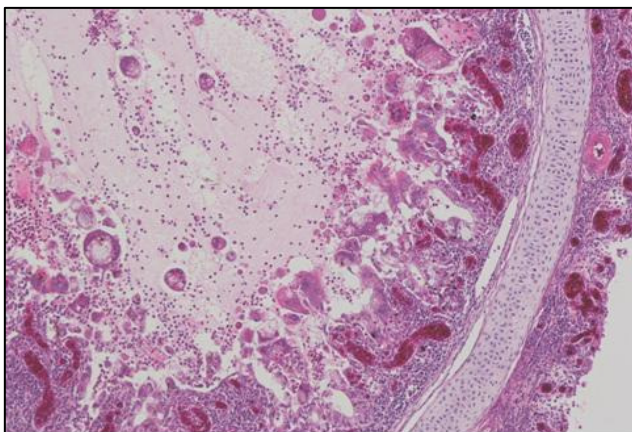


图 5 鼻腔 (No. 11)

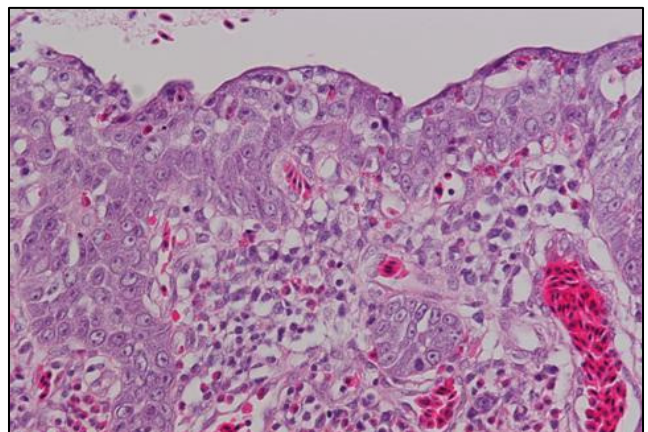


图 6 喉頭 (No. 7)

採卵鶏飼養農場で発生した伝染性喉頭気管炎（ILT）

北部家畜保健衛生所

○五反田桃子 上川真希佳

はじめに

当所管内の採卵鶏飼養農場において、県内で13年ぶりとなる伝染性喉頭気管炎（ILT）の発生を認めたので、その概要を報告する。

方法

1. 農家概要

発生農家は高床式ウィンドレス鶏舎（1～4号鶏舎）で、採卵鶏約182,000羽を飼養していた。また、飼養鶏は県内の育すう農場から約120日齢で導入し、ILTワクチンは2回接種されていた。

2. 発生状況

平成24年5月30日、4号鶏舎において141日齢の鶏群の死亡率が0.09%に上昇した（通常の死亡率は0.03%前後）。6月14日、2号鶏舎において615日齢の鶏群の死亡率が0.07%に上昇し、鶏は異常呼吸音「ゴロゴロ音」を呈していた。

3. 病性鑑定

5月30日の死亡鶏4羽（検体No. 1～4）、6月14日の死亡鶏3羽（検体No. 5～7）を検査材料とし、次のとおり実施した。

1) 疫学調査

現地確認及び畜主等に聞き取りを実施した。

2) 現地解剖

病性鑑定材料とする鶏を選択するに当たって、まず現地で解剖を実施し、携帯電話を用いて病変部画像を速やかに当所へ送信した。

3) 病理学的検査

病理解剖後、定法により病理組織学的検査を実施した。併せて、検体No. 5～7については、気管粘膜塗抹による迅速診断（「伝染性喉頭気管炎の塗抹による迅速診断法」（小田切晴美ら、鶏病研究会報、1981年、第17巻161-166））を実施した。

4) ウイルス学的検査

発育鶏卵によるウイルス分離を実施した。また、遺伝子検査として、PCR検査を実施するとともに、分離ウイルスの性状を確認するため制限断片長多型解析（RFLP）法を財団法人化学及血清療法研究所に依頼した。

5) 細菌学的検査

定法により実施した。

成績

1. 疫学調査

- 1) ひな導入元が同一の他農場においては、異常鶏の発生は無かった。
- 2) ひな導入元において、21日と68日齢に2回ILTワクチンをスプレー接種していた。
- 3) 部外者の農場への立入制限や消毒は、飼養衛生管理基準に従い実施されていた。また、野鳥や野生動物の侵入防止対策も実施されていた。

2. 現地解剖

気管に出血を認めたため、携帯電話を用いてこの画像を速やかに当所へ送信した（図1）。



図1 気管の出血（現地からの画像）

3. 病理学的検査

1) 剖検所見

気管粘膜に、粘液、偽膜様物及び血様滲出物の付着を認めた（図2）。

2) 気管粘膜塗抹による迅速診断

粘膜上皮細胞の合胞体形成と核内封入体を認めた（図3）。

3) 病理組織所見

喉頭気管，肺，鼻腔，結膜の粘膜上皮細胞に合胞体の形成と核内封入体を認めた（図4）。



図2 気管粘膜の粘液，偽膜様物及び血様滲出物の付着

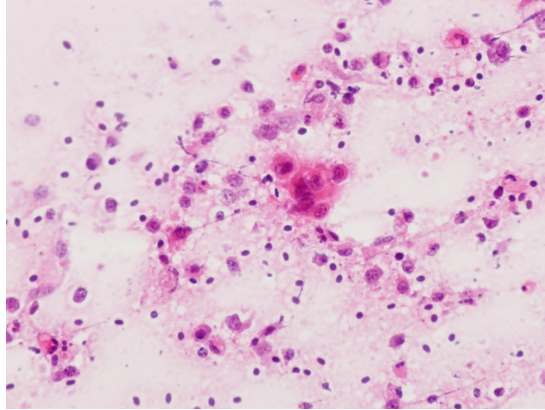


図3 気管粘膜塗抹による粘膜上皮細胞の合胞体形成と核内封入体

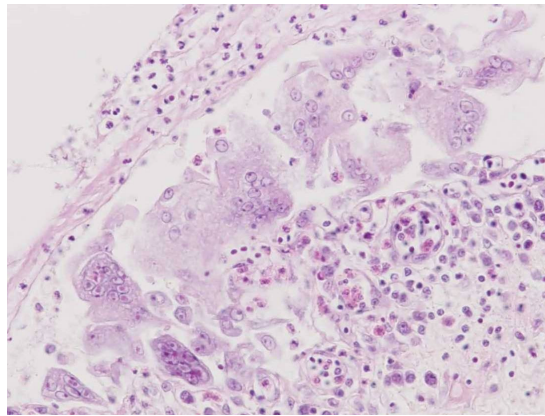


図4 喉頭気管の粘膜上皮細胞の合胞体形成と核内封入体

4. ウイルス学的検査

1) ウイルス分離

漿尿膜にポックの形成を認め、ILT ウイルスを分離した（図5）。

2) 遺伝子検査

検体 No. 1～5 において、ILT ウイルス遺伝子を検出した。ILT ウイルスの RFLP パターンは、平成 17 年から 19 年に九州地方で分離された株と同一のパターンであり、野外株であった（表 1）。

5. 細菌学的検査

有意菌は分離陰性であった。

6. 診断

以上の検査結果から、検体 No. 1～5 を ILT と診断した（表 2）。



図5 発育鶏卵の漿尿膜のポックの形成

表1 ILT ウイルス遺伝子の RFLP パターンの比較

標的 遺伝子	制限酵素	分離 ウイルス	ワクチン株				標準株 NS-175
			①	②	③	④	
TK	Msp I	A	A	A	B	B	B
	HaeIII	A	A	A	B	B	B
	Hha I	A	A	A	A	A	A
TKII	Msp I	A	A	A	B	B	B
	HaeIII	A	A	A	B	B	B
	Hha I	A	A	A	A	A	A
ICP4	Msp I	A	C	C	B	A	A
	HaeIII	A	A	A	B	B	C
	Hha I	A	A	A	B	B	D

表2 病性鑑定結果のまとめ

検体 No	病理学的検査			ウイルス学的検査	
	剖検所見	組織所見	気管粘膜塗抹	遺伝子検査	ウイルス分離
1	+	+	NT*	+	+
2	+	+	NT	+	+
3	-	+	NT	+	-
4	+	+	NT	+	+
5	+	+	+	+	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-

※NT: No tested

対策

1. 農場及び鶏舎への出入りの際の消毒を徹底した。
2. 関連農場間の人の交流を中止した。
3. 6月14日のILT発生後、飼養鶏全羽にILTワクチンの追加接種を実施した。

まとめ及び考察

1. 現地から携帯電話を活用し、病変部の画像を送信することで、現地・当所・病性鑑定課で情報を共有し早期にILTを疑うことができた。
2. 発生は、野外株によるものであることが判明したが、感染経路については、不明であった。
3. ワクチンを追加接種し、その後発生を認めなかったことから、ワクチンの追加接種は有効であったと考えた。
4. 実施した対策により、6月下旬以降、農場でのILT発生は終息し、関連農場への伝播も防止することができた。

*Enterococcus faecalis*による牛の死産事例

西部畜産事務所

○兼廣愛美 岸本加奈子

はじめに

*Enterococcus faecalis*とは、ヒトや動物の腸管内に常在するグラム陽性の Lancefield D 型レンサ球菌で腸球菌の1菌種である。ヒトでは免疫低下などにより易感染状態にある場合、心内膜炎や敗血症、尿路感染症等の原因菌となることが知られており、また近年、院内感染原因菌として、バンコマイシンに耐性を示す腸球菌の出現が問題視されている。牛では、乳房炎の原因菌の1つとして知られているが、異常産の原因菌としては知られていない。

今回、県内の酪農家において *E.faecalis* を原因とする死産事例が発生したのでその概要と、当該農場の状況調査について報告する。

材料と方法

1. 発生概要

発生農場は、搾乳牛（ホルスタイン）約40頭を飼養する酪農家で、平成24年6月11日早朝畜主が死産（2産目）を発見した。母牛は平成21年1月生まれで1産目は正常に分娩し、今回も分娩前後に臨床上の異常は認められなかった。

2. 死産事例

1) 材料

死産胎子（胎齢255日齢）1頭と母牛の血液及び血清を材料に供した。

2) 血液検査

母牛の血液を用いて、RBC, WBC, Ht, TP, Alb, BUN, T-cho, GOT, GGT, CPK, Mg, Ca, IP の13項目について実施した。

3) 病理学的検査

死産胎子を病理解剖後、主要臓器及び胎盤を10%ホルマリン固定し、常法によりパラフィン包埋後薄切して、HE染色及びグラム染色を行い鏡検した。

4) ウイルス学的検査

胎子主要臓器を用いて常法によりウイルス分離を実施した。また母牛血清、胎子心嚢水及び胸水を抗体検査（アカバネ、アイノ、チュウザン、イバラキ、IBR、BVD）に供した。

5) 細菌学的検査

ア 細菌分離及び同定 胎子の主要臓器（脳、腎臓、心臓、肝臓、脾臓、肺及び第四胃内容）の10%乳剤を用いて、一般細菌、腸内細菌、カンピロバクター属菌を標的として、常法により菌分離及び同定を実施した。

イ 遺伝子検査

(ア) 腸球菌病原性遺伝子検査 分離同定検査により腸球菌と同定された菌株を検体として、菌同士の凝集と細胞への付着に關与する aggregation substance 産生 (*asa I*) 遺伝子及び溶血素産生能に關与するヘモリジン産生 (*cytA*) 遺伝子については、Huycke ら¹⁾の方法で、バイオフィルム形成能に關与する腸球菌表面タンパク質 (*Esp*) 遺伝子については Shankar ら²⁾の方法で PCR 法により実施した。

(イ) 腸球菌薬剤耐性遺伝子検査 アミノグリコシド系薬剤に対する耐性に關与するアミノ配糖体 (AG s) 耐性遺伝子については、Klundert ら³⁾の方法で、バンコマイシンに対する耐性に關与するバンコマイシン耐性 (*vanA* 及び *B*) 遺伝子については、Dutka-Malen ら⁴⁾の方法で PCR 法により実施した。

ウ 薬剤感受性試験 微量液体希釈法及び一濃度ディスク拡散法により、アモキシシリン (AMPC)、アンピシリン (ABPC)、ペニシリン (PC)、セファゾリン (CEZ)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、ゲンタマイシン (GM)、エリスロマイシン (EM)、バンコマイシン (VA)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、オフロキサシン (OFX)、レボフロキサシン (LVFX)、エンロフロキサシン (ERFX) の 14 薬剤について実施した。

3. 状況調査

1) 材料

当該母牛及び同居牛 5 頭 (No. 1~5) の直腸便を材料に供した。

2) 細菌学的検査

ア 細菌分離及び同定 *E.faecalis* を標的として、Enterococcosel Ager (BBL) 培地を用いて常法により実施した。

イ 遺伝子検査 腸球菌病原性遺伝子 (*asa I*, *cytA* 及び *Esp* 遺伝子) 及び腸球菌薬剤耐性遺伝子 (AG s 耐性遺伝子, *vanA* 及び *vanB* 遺伝子) について、死産事例の遺伝子検査と同様の方法 (2, 5), イ) で実施した。

ウ 薬剤感受性試験 死産事例の薬剤感受性試験と同様の方法及び薬剤 (2, 5), ウ) で実施した。

成績

1. 死産事例

1) 血液検査

白血球数の増加 (27,290 個/ μ l) が認められたが、他に異常値はなかった。

2) 病理学的検査

ア 病理解剖所見

胎子に赤色胸水と心嚢水の貯留が認められたが、他に異常は認められなかった。

イ 病理組織学的所見

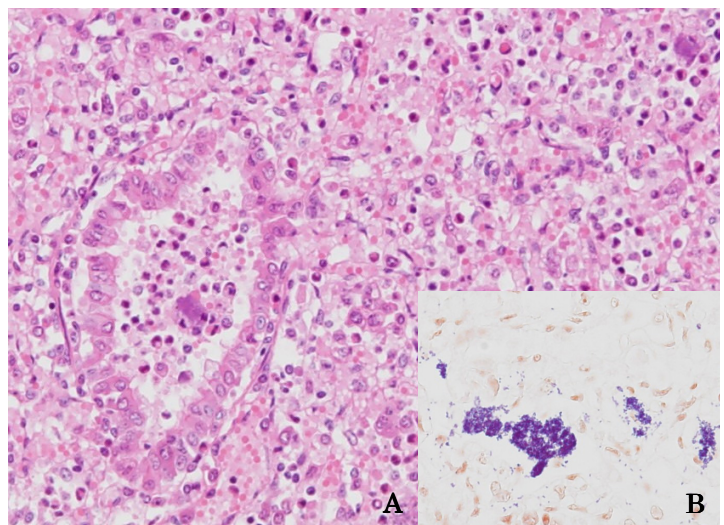


写真1 A. 細気管支及び肺胞腔内の細菌塊 (HE 染色 : $\times 200$)

B. 肺胞腔内の細菌塊 (グラム染色 : $\times 400$)

肺の肺胞壁毛細血管に、中等度のうっ血及び出血が認められ、細気管支及び肺胞腔内には、グラム陽性球菌の増殖と中等度の好中球、マクロファージの浸潤及びグラム陽性球菌を貪食したマクロファージがび慢性に認められた（写真1）。また胎子胎盤の絨毛膜絨毛の一部に、充血、グラム陽性球菌の増殖、変性した好中球及びマクロファージの浸潤とグラム陽性球菌を貪食したマクロファージ及び線維素析出が認められた（写真2）。

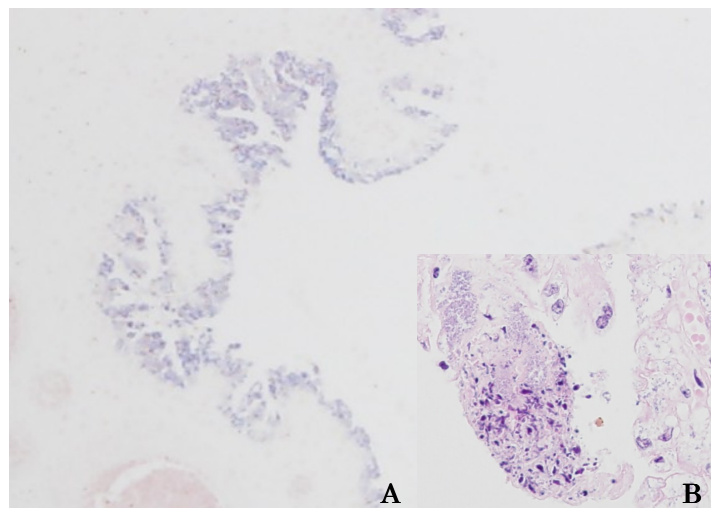


写真2 A. 胎子胎盤絨毛膜絨毛の細菌増殖（グラム染色：×40）
B. Aの拡大（HE染色：×400）

さらに尿膜表面にもグラム陽性球菌の付着及び増殖が認められた。

3) ウイルス学的検査

ウイルス分離検査は陰性であった。各種抗体検査についても、有意な抗体上昇は認められなかった。

4) 細菌学的検査

ア 細菌分離及び同定

胎子の脳、腎臓、肝臓、脾臓、肺及び第四胃内容から、細菌が $1.8 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^6$ cfu/ml 程度純培養状に分離され、性状検査及びラピッド ID32 ストレップアピの結果から、*E.faecalis* と同定された。

イ 遺伝子検査

腸球菌病原性遺伝子については、すべての分離株がいずれの遺伝子も保有していなかった。腸球菌薬剤耐性遺伝子については、脾臓から分離された株以外のすべての分離株が、AGs 耐性遺伝子を保有していた（表1）。

ウ 薬剤感受性試験

分離 *E.faecalis* は、PC, CEZ, KM, GM, EM, OTC, LVFX 及び SM の 8 薬剤で耐性を認め、特に MIC 値から KM, GM, EM 及び LVFX に対して高度耐性を示した。ABPC, AMPC, ERFX 及び VA に対しては感受性を認めた。

なお、すべての分離株の薬剤感受性試験結果は同じ傾向を示した。

表1 *E. faecalis* 分離・遺伝子検査結果

	死産事例	母牛	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
分離結果	+	+	+	+	+	-	-
<i>asa I</i>	-	-	-	-	-	/	
<i>cyIA</i>	-	-	-	-	-		
<i>Esp</i>	-	-	-	-	-		
AGs耐性	+	+	+	+	+		
<i>vanA</i>	-	-	-	-	-		
<i>vanB</i>	-	-	-	-	-		

asa I, *cyIA*, *Esp* : 病原性遺伝子

AGs耐性, *vanA*, *vanB* : 薬剤耐性遺伝子

2. 状況調査

1) 細菌分離及び同定

母牛及び同居牛 No. 1～3 の直腸便から *E. faecalis* が分離された (表 1)。

2) 遺伝子検査

腸球菌病原性遺伝子については、すべての分離株がいずれの遺伝子も保有していなかった。腸球菌薬剤耐性遺伝子については、すべての分離株が、AGs 耐性遺伝子を保有していた (表 1)。

3) 薬剤感受性試験

分離 *E. faecalis* の薬剤感受性試験結果は、すべての株が死産事例で分離された株と同様の結果を示した (表 2)。

表 2 薬剤感受性試験結果

薬剤	検体	死産例 分離株	母牛	No.1	No.2	No.3	ブレイク ポイント
PC		3.12	3.12	3.12	1.56	1.56	0.125
ABPC		1	1	1	1	1	16
CEZ		32	32	16	32	32	4
KM		128<	128<	128<	128<	128<	128
GM		258<	258<	258<	258<	258<	32
EM		128<	128<	128<	128<	128<	8
OTC		64	64	64	64	64	16
LVFX		128<	128<	128<	128<	128<	NT
ERFX		0.39~0.78	0.39	0.39	0.39	0.78	4
VA		0.78	0.78	0.2	0.78	0.78	16
CP		32	32	32	32	32	32
AMPC		S	S	S	S	S	
SM		R	R	R	R	R	
OFX		I	I	I	I	I	

まとめ及び考察

今回の死産事例は、母牛に化膿性胎盤炎が認められ、死産胎子の各種臓器から *E. faecalis* が有意に分離されたことから、母牛が保有していた *E. faecalis* が、胎盤を介して胎子に感染し、死産を引き起こしたものと考えられた。また、農場の状況調査において、死産事例で分離された菌株と同様の性状、遺伝子保有及び薬剤感受性傾向を有する *E. faecalis* が分離されたことから、常在する *E. faecalis* が感染源となったものと推察された。

本来、*E. faecalis* は牛の腸管内に常在し、その病原性は低く、易感染状態において感染する日和見感染菌と位置づけられている。一方で牛の周産期における免疫反応は、妊娠を維持継続するためにさまざまなメカニズムによって抑制されていることが知られている。生理学的変化に加えて、妊娠、出産による乳牛の受けるストレス強度の増加は、免疫機能の低下をもたらし、周産期における乳牛は一種の免疫不全状態にあるとされている⁵⁾。このような状況にあっては、日和見感染菌の感染リスクは高まると考えられ、今回の感染成立の一因となったと推察された。したがって周産期における母牛の飼養衛生管理については、日和見感染菌の感染リスクもふまえて特段の留意が必要と考えられた。

死産事例及び農場の状況調査において分離された *E. faecalis* は、腸球菌病原性遺伝子を保有していなかったが、腸球菌薬剤耐性遺伝子の一つである AGs 耐性遺伝子を保有していた。また、薬剤感受性試験においても多剤耐性を示し、特にアミノグリコシド系薬剤及びマクロライド系薬剤に対して高度耐性が認められた。腸球菌は元々、アミノグリコシド系薬剤やセフェム系薬剤の細胞内への取り込みが低いため、MIC 値で 50 µg/ml 程度の低度耐性を自然耐性として持っている。しかしながらペニシリンやマクロライド系薬剤に対する耐性や、アミノグリコシド系薬剤に対する高度耐性は獲得耐性であり、さらに腸球菌はあらゆる薬剤に対して耐性を獲得しうることが知られている⁶⁾。このことから、今回の分離菌のペニシリンやマクロライド系薬剤及びアミノグリコシド系薬剤に対する耐性は、獲得耐性であることが示唆された。

今回分離された *E. faecalis* は、いずれの株もバンコマイシンに対する MIC 値は 0.78 µg/ml で、*vanA* 及び *B* 遺伝子を保有していなかった。バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) とは、薬剤感受性試験における

バンコマイシンの MIC 値が 16 μ g/ml 以上であるか、あるいは *vanA*~*C* 遺伝子を保有する腸球菌のことで、感染症法上 5 類感染症に指定されている^{6) 7) 8)}。VRE は、畜産現場においてバンコマイシンに類似する抗生物質であるアボパルシンを飼料の品質維持や家畜の成長促進を目的として飼料添加し続けたことにより薬剤耐性を獲得した腸球菌であると言われており、これがヒトへと経口感染したと考えられている⁶⁾。検査結果から分離菌は VRE ではなかったが、すでに多くの薬剤に対して耐性を獲得していたことに加え一部薬剤に対しては獲得耐性を示唆する結果であったこと、及び同居牛から分離された菌株も同様の結果を示したことから、常在している腸球菌の薬剤耐性化が推察され、農場内での抗生剤使用に一層の注意が必要であると考えられた。

参考文献

- 1) Huycke MM and Gilmore MS: Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* (1995) 34 152-156.
- 2) Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G and Gilmore MS: Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* (1999) 67: 193-200.
- 3) Van de Klundert Jam and Vliegenthart JS: PCR detection of genes coding for aminoglycosidemodifying enzymes; in *Diagnostic Molecular Microbiology*, Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White TJ eds, American Society for Microbiology, Washington, DC (1993) pp. 547-552.
- 4) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 33:24-27, 1995.
- 5) 石川潤: 乳牛の周産期の免疫応答, 畜産の研究, 45, 307-312 (1991)
- 6) 谷本弘一, 池康嘉: 基礎・臨床の両面からみた耐性菌の現状と対策 4 バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE), *モダンメディア*, 53 巻 6 号, 6-13 (2007)
- 7) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 第 12 条 第 1 項 第 2 号
- 8) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則 第 4 条 第 3 項

*Pasteurella multocida*による乳用牛の乳房炎

北部家畜保健衛生所

○上川真希佳 細川久美子

はじめに

Pasteurella multocida (*P. multocida*) は牛の肺炎の原因菌として知られているが、牛の乳房炎を引き起こすという報告は少なく、国内では乳用牛において2症例、肉用牛において1症例認められている^{1),2)}。

今回、管内酪農家において、乳房の熱感、硬結及び乳汁中に凝塊物を認めた牛の病性鑑定を実施した結果、*P. multocida*による乳房炎と診断したので、その概要を報告する。

方法

1. 農家概要

発生農家は対尻式つなぎ方式で成牛16頭(搾乳牛及び乾乳牛)、子牛・育成牛11頭を飼育しており、自家産の牛だけでなく、北海道からの導入牛等もいた。

2. 発生状況

平成24年8月中旬～下旬、28か月齢の牛の右後分房に熱感、硬結及び乳汁中に凝塊物を認め、P.Lテストにより凝集+++、色調+であった。なお、当該牛は右後分房以外には異常を認めず、発熱や呼吸器症状は認められなかった。

3. 病性鑑定

当該牛の右後分房の乳汁及び鼻腔ぬぐい液を検査材料とし、次のとおり細菌学的検査を実施した。

1) 分離培養

羊血液寒天培地で37℃、24時間好気培養を行った。

2) 菌株の同定

IDテストHN-20ラピッド「ニッスイ」を用いて行った。

3) 血清型別

動物衛生研究所に依頼した。

4) 薬剤感受性試験

8薬剤(ペニシリン、アンピシリン、ジクロキサシリン、セファピリン、ネオマイシン、エリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、エンロフロキサシン)についてミューラーヒントン5%ヒツジ血液寒天培地を用いて実施した。

成績

1. 分離培養

乳汁からムコイド状コロニーが純培養状に 1.3×10^4 cfu/ml 分離された。分離菌は、グラム陰性短桿菌で、非溶血性、非運動性、カタラーゼ及びオキシダーゼは陽性であった。鼻腔ぬぐい液からは有意菌は分離されなかった。

2. 菌株の同定

コード No. 7415750 で、*P. multocida* (100%) と同定された。

3. 血清型別

莢膜抗原は Carter の A 型、菌体抗原は Heddleston の 3・4 型であった。

4. 薬剤感受性試験

エリスロマイシンに耐性を示したが、セファピリン等に感受性を示した (表 1)。

表 1 薬剤感受性試験結果

分類	成分名	判定※
ペニシリン系	ペニシリン	S
	アンピシリン	S
	ジクロキサシリン	S
セフェム系	セファピリン	S
アミノグリコシド系	ネオマイシン	S
マクロライド系	エリスロマイシン	R
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	S
ニューキノロン系	エンロフロキサシン	S

※S:感受性, R:耐性

5. 対策及び成果

当該牛は隔離し、搾乳は最後に行った。感染分房の乳汁は適切に廃棄した。また、薬剤感受性試験結果判明後、セファピリンナトリウムを乳房内に注入した。その結果、当該牛の乳汁中の体細胞数は早期に減少し（図1）、同居牛に乳房炎や呼吸器症状は認められなかった。

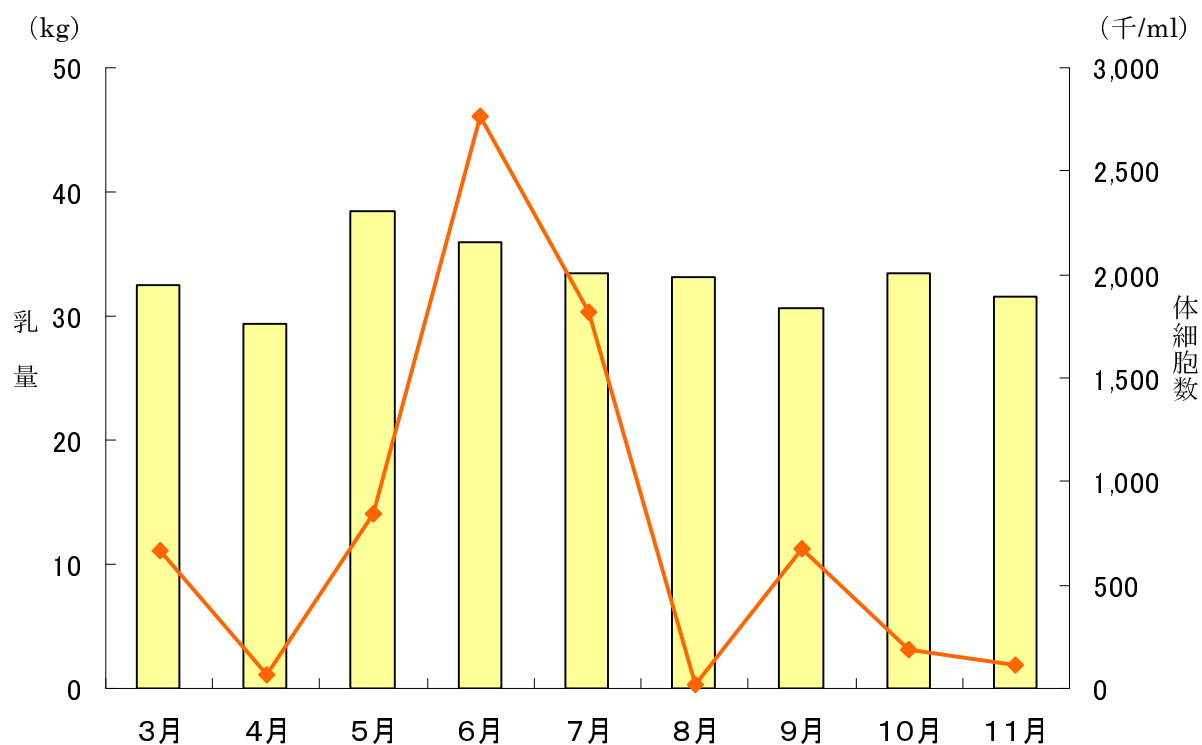


図1 乳量と体細胞数の変化

まとめ及び考察

1. 今回、症例報告数の少ない *P. multocida* による乳房炎と診断した。
2. 血清型は Carter の A 型、Heddleston の 3・4 型と判明したが、発症原因の究明には至らなかった。
3. 実施した対策により同居牛に乳房炎や呼吸器病を認めず、感受性薬剤の投与により当該牛は早期に治癒した。

参考文献

- 1) 後藤利隆; *Pasteurella multocida* による牛の乳房炎と補体結合反応の診断的意義, 臨床獣医, 13, 66-71 (1995)
- 2) 又吉正直, 船倉栄ほか; *Pasteurella multocida* が分離された黒毛和種繁殖牛の乳房炎, 日獣会誌, 63, 524-526 (2010)

酪農家における下痢症対策と初乳検査の有用性

北部家畜保健衛生所

○細川久美子 保本朋宏

はじめに

平成 24 年 8 月 7 日、管内酪農家において下痢を発症した子牛 1 頭が死亡した。翌 8 日に死亡した子牛及び同居していた子牛 6 頭の病性鑑定を実施、更に 8 月 13 日に下痢を発症した子牛 1 頭の病性鑑定を実施した。その結果、1～2 週齢ではクリプトスポリジウム、3～4 週齢ではコクシジウムの関与が疑われた。

また、初乳の検査において大腸菌などの細菌汚染が確認されたため、これらの衛生対策を実施し、一定の効果を果たしたのでその概要を報告する。

材料及び方法

1. 疫学調査

哺乳子牛の飼養状況及び初乳の衛生状況を調査した。

2. 糞便検査

糞便 8 検体（13 日齢 1 検体を No. 1, 3～4 週齢 7 検体を No. 2～8）

1) 寄生虫学的検査：直接塗沫法またはショ糖浮遊法で実施した。

2) 細菌学的検査：5% 羊血液寒天培地及び DHL 寒天培地を用い、定法に従って 37℃ 24 時間好気培養並びに 5% 羊血液寒天培地を用いて 37℃ 24 時間嫌気培養を実施した。

3) ウイルス学的検査：ロタウイルス簡易キット（‘栄研 ‘ディップスティックロタ）を使用した。

3. 初乳検査

未消毒のバケットミルカーで採取し、加熱処理未実施の初乳を No. 1～4。消毒済みバケットミルカーで採取し、加熱処理未実施の初乳を No. 5。消毒済みバケットミルカーで採取した後、60℃ 30 分加熱処理した初乳を No. 6 とした。（図 1）これらを材料とし、5% 羊血液寒天培地及び DHL 寒天培地を用いて定法に従い 37℃ 24 時間好気培養を実施した。

	バケットミルカー 消毒	60℃30分 加熱処理
No. 1～4	×	×
No. 5	○	×
No. 6	○	○

図 1 初乳

成績

1. 疫学調査

哺乳子牛の飼養状況調査から、農場では子牛を出荷後清掃や敷料の交換を実施せず、牛房に生まれてすぐの子牛を入れる場合があることが判明した。また、子牛が下痢を発症したらその都度、駆虫薬を投与しており、特定の駆虫プログラムはなかった。

初乳の衛生状況について、当該農場ではバケットミルカーの数が少ないため、初乳専用のバケットミルカーはなく、乳房炎乳の搾乳を実施するバケットミルカーを洗浄し、未消毒のまま初乳の搾乳に使用して

いた。初乳は採取後、半日から1日冷蔵保存され、ペットボトルで冷凍保存されていた。

2. 糞便検査

- 1) 寄生虫学的検査：13日齢の糞便からクリプトスポリジウムオーシストが検出された。3～4週齢の7検体のうち6検体からコクシジウムオーシストが検出された。
- 2) 細菌学的検査：有意菌分離陰性。
- 3) ウイルス学的検査：ロタウイルス簡易キット（‘栄研‘ディップスティックロタ）陰性。

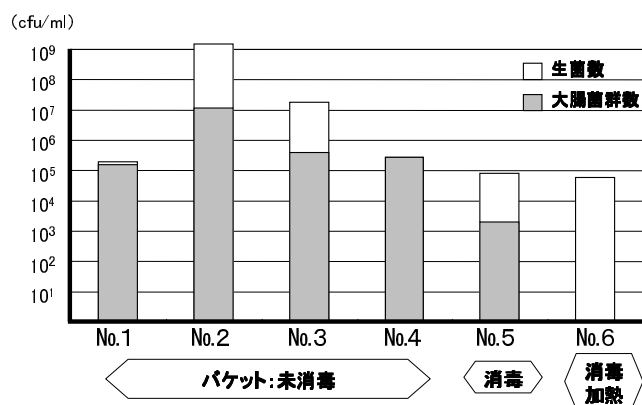


図2 初乳中の細菌数

3. 初乳検査

No. 1～4は生菌数が10⁵～∞cfu/ml、このうち大腸菌群数は10⁵～10⁷cfu/mlであった。

No. 5は生菌数が8.2×10⁴ cfu/ml、このうち大腸菌群数は2×10³ cfu/mlであった。

No. 6においては生菌数6×10⁴cfu/ml、大腸菌群は分離されなかった。

対策

1. 牛房の清掃及び消毒

子牛を出荷し、新しい子牛を牛房へ入れる時の牛房の清掃、消毒及び敷料の交換を指導

した。指導前は敷料の交換等を実施せず新しい子牛を牛房に入れていたが、指導後は牛房の清掃、消毒を実施するようになり、清掃後は2～3日牛床を乾燥させ、消石灰を撒き、新しい敷料をいれてから子牛を入れるようになった。

2. 駆虫プログラムの設定

農場では駆虫薬の投与時期が定まっていなかったが、7日毎にサルファ剤を投与する駆虫プログラムを定めた。

3. 初乳の衛生対策

1) バケットミルクの洗浄及び消毒

指導前は乳房炎乳を搾るバケットミルクと保存用初乳を搾るバケットミルクを区別しておらず、使用後のバケットミルクは洗浄のみで消毒していなかった。指導後はバケットミルクを機械による自動洗浄を利用して洗浄し、塩素系の消毒薬で消毒するようになった。

2) 初乳の保存

指導前の初乳の保存は、搾乳後、半日から1日間冷蔵庫で保管後、ペットボトルへ入れて冷凍保存していたが、指導後は初乳を60℃のお湯で湯せんによる加熱処理を実施してから冷凍保存することとした。

まとめ

牛ロタウイルス病やクリプトスポリジウム症は生後の早い時期から下痢の発症が認められ、コクシジウム症は3週齢頃から下痢が認められる¹⁾。

当該農場では哺乳子牛は生後1週間から2週間で下痢を発症し、治癒した後、3～4週齢で再び下痢を発症していた。検査結果は一般的な子牛の下痢発生時期と同様であり1度目の下痢がクリプトスポリジウ

ム症， 2 度目の下痢はコクシジウムが原因であった。

寄生虫対策及び初乳の衛生対策を実施した結果， 哺乳子牛の下痢は認められなくなった。このため， 以前は下痢のため出荷が遅れていたという問題が解消された。

初乳中の生菌数が 1 m l 中 1 万を越えると哺乳子牛に元氣， 活力の低下や下痢が発症すると報告されている²⁾。今回の事例から， 哺乳子牛で下痢を発症する農場に対し， 糞便検査のみでなく同時に初乳の細菌検査の実施も有用であると考えた。通常， 初乳検査は I g G1 の測定に重きを置かれがちだが， 細菌検査も重要であると考え。今後は， 受精卵移植実施の酪農家を中心に哺育育成指導の一環として初乳の検査を実施し， バケツミルクの洗浄・消毒， 初乳の 60℃30 分加熱処理等を指導し， 良質な初乳の確保をすすめていきたい。

参考文献

1) ちくさんクラブ 21 平成 20 年 2-3 月号

2) 臨床獣医 2007. Jan. Vol. 25, No. 1 凍結初乳の細菌汚染とその対策

広島県内で流行した牛 RS ウイルス病

西部畜産事務所

○清水 和, 桑山 勝

はじめに

牛 RS ウイルス（以下 BRSV）病は、単独で発熱と呼吸器症状を主徴とし、泌乳量の低下、妊娠牛では流産などの症状を示し¹⁾、牛飼養農家にとって経済的損失が大きい疾病である。また、呼吸器病症候群 (BRDC)の一次要因の一つともなり、他のウイルスや細菌等と複合感染を引き起こす²⁾ことから、迅速な原因究明によるまん延防止と予防対策が重要になる。今回、県内で流行した BRSV 病について、各種診断方法の有効性を検証するとともに、現行ワクチンの有効性を検討するために分離株の遺伝学的解析を実施したので、その概要を報告する。

材料と方法

1 発生状況及び材料

平成 24 年 1 月から 4 月に県内の酪農家 6 戸、肉用牛飼養農家 9 戸の計 15 戸で発熱、水様鼻汁漏出等を主症状とする呼吸器病が発生した。発症牛から採材後、Earle's 液³⁾に浸漬した鼻腔スワブ 59 検体及びペア血清 42 検体を材料とした。

2 方法

簡易検査は、ヒト RSV 迅速抗原検出キット「Binax NOW RSV テスト」(栄研化学株式会社)による抗原検索を実施した。遺伝子検査は、鼻腔スワブから ISOGEN-LS 試薬 (株式会社ニッポンジーン)を用いて RNA を抽出し、桐沢らの報告した G 蛋白領域を標的としたプライマー⁴⁾(表 1)を用いて RT-nested PCR 法による遺伝子検査を、次の条件で実施した。TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 (タカラバイオ株式会社)を使用し、42°C 30 分間の逆転写反応により cDNA を合成した後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 45 秒を 30 サイクルで 1st PCR 反応を行い、その後、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社)を使用し、同様の条件で 2nd PCR 反応を行った。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色の後、目的とする遺伝子の増幅の有無を確認した。

表 1 遺伝子検査に使用したプライマー

primer		塩基配列(5'→3')	産物サイズ
1st PCR	RSF3	ATC ACT CGT CAT CAC AGC CA	580bp
	RSR1(reverse)	AGA GGA TGC CTT GTT GTG GA	
2nd PCR	RSF2	AAA GCA CCA CAC TGT CCC AA	300bp
	RSR2(reverse)	TTT GAG GGT GAT TGT AGG GG	

ウイルス分離は、鼻腔スワブを、Vero 細胞に接種、34°C で 10~14 日間回転培養、3 代継代した。抗体検査は、NMK7 株を用い中和試験を実施した。分離した BRSV について、Valarcher らの報告した G 蛋白領域を標的としたプライマー⁵⁾を用いて遺伝子を増幅し、得られた PCR 産物について、Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いダイレクトシーケンス法により塩基

配列を決定した。得られた塩基配列について、解析ソフト MEGA5 ver5.10 を用い、既報の国内分離株及び比較対照株との相同性を比較し、系統樹を作成後、Valarcher らの報告⁵⁾ に従いサブグループに分類した。なお、比較対照株には、1968 年の国内分離株 NMK7、ワクチン株 rs-52 及び米国分離株 236-652 を用いた。また、発症牛について、これらの検査結果と合わせて、個体別に臨床症状、体温及び白血球数について、発生状況を集計した。

成績

1 各種診断方法の比較

各種検査法により陽性と判定した農家戸数は、簡易検査：10/15 戸、遺伝子検査：10/15 戸、ウイルス分離：9/15 戸、抗体検査：11/15 戸(未検査を除く)であり、ウイルス分離及び抗体検査の結果、陽性であった 13/15 戸の発生を BRSV 病によると診断した(表 2)。このうち、簡易検査または遺伝子検査が陽性であった農家は、11/13 戸であった。残る 2/15 戸のうち、1 戸(農家 No.14)は遺伝子検査が陽性であったが、抗体検査が未実施であった

表 2 各種検査結果

農家 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
簡易検査 (9/15)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
遺伝子検査 (10/13)	+	+	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	NT	-	+	-
ウイルス分離 (9/15)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
抗体検査 (11/12)	+	NT	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	NT	-

ことから、BRSV 病と確定に至らなかった。他の 1 戸(農家 No.15)は簡易検査のみ陽性であったが、血液検査で白血球数の増加を認め、細菌学的検査で鼻腔スワブから *Pasteurella trehalosi*, *Moraxella* 属菌を有意に分離したため除外した。

() : 陽性戸数/検査戸数 NT:未検査, 酪農家, 肉用牛飼養農家

BRSV 病と診断した 13 戸 54 頭を、簡易検査が陽性であった個体と陰性であった個体について、個体別の発生状況を集計した結果、簡易検査が陽性であった個体は、水様鼻汁を呈している割合が高く、遺伝子検査、ウイルス分離、抗体検査でも高率に陽性であった(表 3)。簡易検査が陰性であつ

表 3 個体別発生状況

	簡易検査	鼻汁漏出	水様鼻汁	体温(°C)	白血球数(個/ μ l)	遺伝子検査	ウイルス分離	抗体検査
陽性	19/21 [※] (91%)	14/21 (67%)	39.0~ 41.0	7,830~ 16,117	16/19 (84.2%)	16/21 (76.2%)	14/15 (93.3%)	
陰性	26/33 (79%)	11/33 (33%)	38.4~ 41.4	4,900~ 20,700	8/26 (30.7%)	3/33 (9.1%)	16/22 (72.7%)	

※合計 54 検体

た個体には、体温の上昇を認めない個体があり、また BRSV 病では感染初期に軽度の白血球減少症を認める⁶⁾が、白血球数が正常値⁷⁾と比較し異常に高い、または異常に低い個体が散見された。

2 遺伝学的解析

ウイルス分離により得られた BRSV 分離株のうち 7 株 (HS1~HS7) の遺伝学的解析を実施した。7 株が分離された農家の概要と場所は表 4 及び図 2 のとおりであった。

表 4 分離された農家の概要

農家 No.	飼養形態	飼養頭数	導入元	発生日月
1	肉用/肥育	150	県内市場	24.1.23
2	肉用/肥育	20	県内市場	24.1.25
3	酪農	40,育20	自家産	24.2.9
4	酪農	30,育15	自家産	24.2.20
5	酪農	40,育20	自家産	24.3.9
6	肉用/肥育	150	県外市場	24.3.14
7	肉用/繁殖	10,子7	自家産	24.4.17



図 2 分離された場所

遺伝子解析により分離株 7 株のうち、6 株 (HS1~HS6) 間の相同性は 99.8%~100% であり、1 株 (HS7) と他 6 株との相同性は 98.4%~98.6% (表 5), 系統樹解析により分離株は全て subgroup III に属した (図 3)。比較対照株のうち subgroup II に属する NMK7 及び rs-52 と分離株との相同性は 90.4%~91.0%, subgroup III に属する 236-652 と分離株との相同性は 93.6%~94.3% であった。

表 5 分離株の塩基配列の相同性

農家 No.	株 No.	HS1	HS2	HS3	HS4	HS5	HS6	HS7
1	HS1							
2	HS2	100						
3	HS3	100	99.8					
4	HS4	100	100	99.8				
5	HS5	99.8	100	100	100			
6	HS6	99.8	100	99.8	100	100		
7	HS7	98.4	98.6	98.5	98.6	98.6	98.6	
	NMK7	90.4	90.6	90.5	90.7	90.6	90.8	90.9
	rs-52	90.4	90.5	90.4	90.5	90.6	90.7	91.0
	236-652	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	94.3

(%)

まとめ及び考察

今回、15 例の発生事例について検討した結果、簡易検査及び遺伝子検査結果と、ウイルス分離及び抗体検査結果は高率に一致した。検査の所

要時間は、簡易検査が 20 分、遺伝子検査が 7 時間であるが、ウイルス分離は長期間の継代培養が必要であり、抗体検査は発症期及び回復期血清を必要とすることから、診断に時間を要する。また、遺伝子検査は特殊な検査器材等が必要であるが、簡易検査は発生現地で簡便に実施が可能であることから、簡易検査と遺伝子検査の併用が迅速診断に有効と思われた。

簡易検査のみ陽性であった 1 例は、細菌学的検査結果から細菌性呼吸器病によるものと推測され、簡易検査における非特異反応が疑われた。加えて、検体別の成績から、簡易検査を実施する際は、鼻汁の状態

などの臨床症状を良く観察し、体温を測定後、発症初期から極期と思われる個体を採材すること、また、非特異反応を防止するためには、膿性鼻汁を呈するなど症状が重篤化し、二次感染を疑う個体は採材しないことに留意が必要であることが再確認された。これらのことから、簡易検査の有効性と診断上の注意点について、各畜産事務所に対して、病性鑑定だより第77号(平成24年10月号)により周知した(図4)。検証した期間において19例のウイルス性呼吸器病を疑う病性鑑定の依頼があったが、このうち13例をBRSV病と診断した。その発生は半数以上を占め、その防御対策として、迅速な原因究明と発生現地におけるまん延防止対策が重要であることから、今後も引き続き迅速診断技術の向上に向けた取り組みが必要と思われた。

G蛋白はウイルス粒子を構成する最も大きな表面の糖蛋白であり、宿主細胞への吸着に関与することから、抗原性の決定に重要な役割を担っており^{9,11)}、ValarcherらはG蛋白領域の系統樹解析により subgroup I からVIに分類している⁹⁾。今回、分離株は subgroup IIIに属し、既報の国内分離株と近縁であった。近年における国内分離株は、今回の分離株と同様に subgroup IIIに属し¹²⁻¹⁴⁾、これらの国内分離株はワクチン株と抗原性状の差を認めなかったという報告^{13, 14)}があることから、本県においても、既存のワクチンの適切な接種が発症予防に有効と推測された。

分離株7株のうち、HS1~HS6株とHS7株では遺伝子の配列がわずかに異なった。その原因は不明であるが、HS7を分離した農家では、他地域からの牛の導入が無い点が他の農家と異なっており、他県における分離事例でも地域によって遺伝子の配列がやや異なる株が分離されていること¹³⁾から、

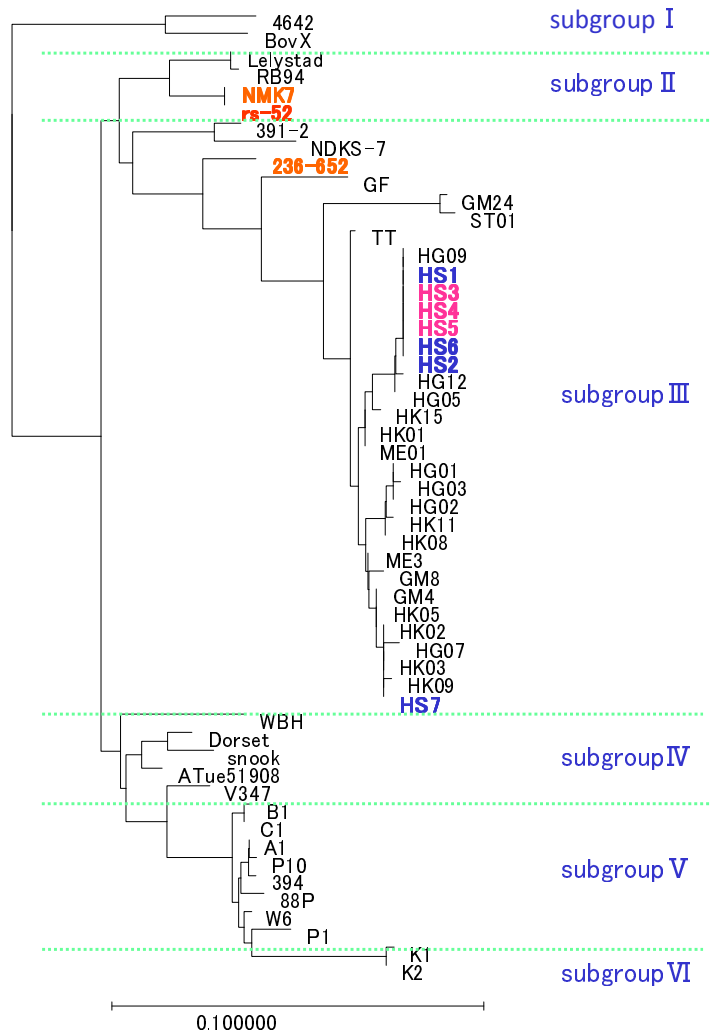


図3 系統樹解析結果 (右に Valacher による subgroup を示した)

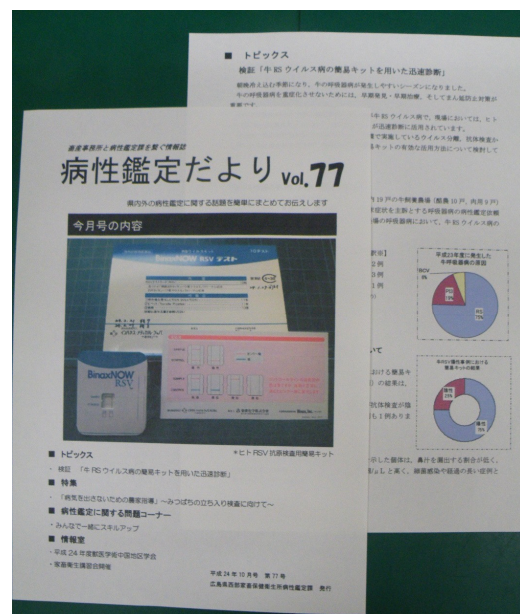


図4 病性鑑定だより第77号

農家の飼養形態または地域による差異を反映している可能性が考えられた。また、分離株と比較対照株との相同性は、山本らの報告¹⁵⁾における1980～2006年の広島県分離株(96.0%から91.1%の相同性)と比較し低下していた。G蛋白領域は遺伝子の保存性が比較的高い部分とされる¹⁶⁾が、今回、G蛋白領域の遺伝子の変異の可能性が考えられたことから、引き続き本県における野外株の流行状況を把握していくことが、ワクチンによる防御効果を検討する上で重要と考えられた。

謝辞

最後に、遺伝子解析及び系統樹解析を実施していただいた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所の小西美佐子先生に深謝します。

参考文献

- 1) 小沼 操ら:牛RSウイルス病, 動物の感染症, 第2版, 近代出版, 112-113(2009)
- 2) 田中 伸一ら:牛呼吸器病症候群(BRDC)の現状と対策(前編), 臨床獣医, 24 (9) 12-18(2006)
- 3) 北村 敬:細胞培養の基本技術, 第1版, 近代出版, 30-63 (1976)
- 4) 桐沢 力雄ら:ウシパラインフルエンザウイルス3型, ウシRSウイルスおよびウシウイルス性下痢・粘膜病ウイルス感染のPCRによる検出, J.Rakuno Gakuen Univ.,19(1),225-237(1994)
- 5) Valarcher F.,et al:Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus, J.Virol.,74,10714-10728(2000)
- 6) 其田 三夫ら:牛RSウイルス感染症, 牛の臨床, 改訂増補第6版, デーリイマン社, 170-171 (1993)
- 7) 安里 章ら:血液一般検査, 家畜共済における臨床病理検査要領, 改訂版, 全国農業共済協会, 103(1997)
- 9) Valarcher F.,et al:Bovine respiratory syncytial virus infection, Vet.Rec.,38,153-180(2007)
- 10) Langedijk J.P.M.,et al:Antigenetic Structure of the Central Conserved Region of Protein G of Bovine Respiratory Syncytial Virus,J.Virol.71(5),4055-4061(1997)
- 11) Karger A.,et al:Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes:G and F proteinbind heparin,J.Gen.Virol.82,631-640(2001)
- 12) 佐藤岳彦:千葉県での牛RSウイルス流行株遺伝子解析, 全国家畜保健衛生業績抄録, 22(2011)
- 13) Yaegashi G.,et al:Genetic and Antigenic Analyses of Bovine Respiratory Syncytial Virus Detected in Japan,J.Vet.Med.Sci.67(2),145-150(2005)
- 14) 酒井 芳子ら:長崎県下における牛RSウイルス流行株の分子学的および抗原学的解析, 全国家畜保健衛生業績抄録, 16(2010)
- 15) 山本 武ら:県内で分離された牛RSウイルス野外株の解析, 広島県獣医師会雑誌,25,21-23(2010)
- 16) Valentova V.,et al:Genetic and Antigenic Analyses of bovine respiratory syncytial virus with emphasis on the G protein,Vet.Med.Sci.48,254-266(2003)

和牛農家の担い手で組織されたコントラクターと集落法人等との 稲わら収集を通じた耕畜連携の推進

西部畜産事務所

○中市後章子 宮本 悟

はじめに

県内の和牛枝肉価格は平成 18 年度、子牛価格は平成 19 年度をピークに下落傾向（図 1）にあり、また、飼料価格は平成 19 年度以降、高値傾向が続いているなど（図 2）、和牛農家の経営環境は年々厳しくなっている。（図 3）この経営環境を改善するためには、自給粗飼料の生産・拡大に取り組み、コストを低減させることが効果的である。

今回、和牛の担い手農家 3 戸で組織するコントラクターの設立が、安価な自給粗飼料である稲わら収集を近隣集落法人等との連携を支援したので、その概要を報告する。

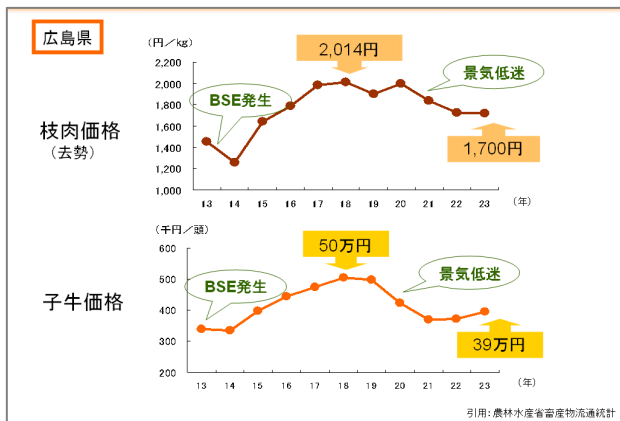


図 1 販売価格

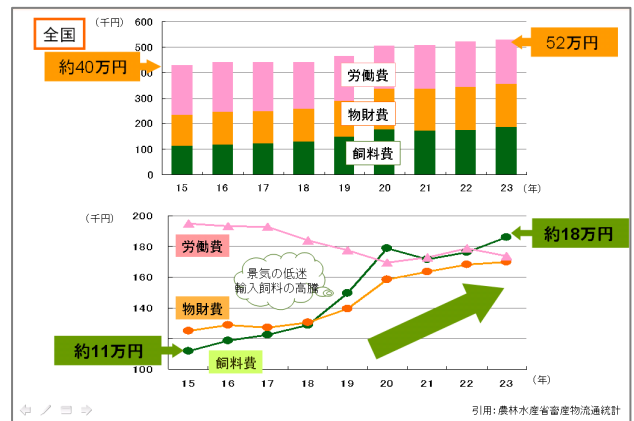


図 2 繁殖農家の生産コスト（子牛 1 頭あたり）

取組内容

1 支援農家

安芸高田市 和牛担い手農家 3 戸

一貫農家 60 頭（繁殖 20，肥育 45）

一貫農家 75 頭（繁殖 25，肥育 50）

繁殖農家 50 頭

2 コントラクター設立と法人化

平成 22 年度まで、担い手農家 3 戸は個別に稲わら収集作業を実施していたが、個別の作業であり、また湿田に対応できない収集調製機械しか所有していないため作業が非効率となっていることについて、当所を始め、市・J A・指導所などの関係機関に相談があった。今回我々は、この課題の解決策として、コントラクター設立とその法人化を検討した。

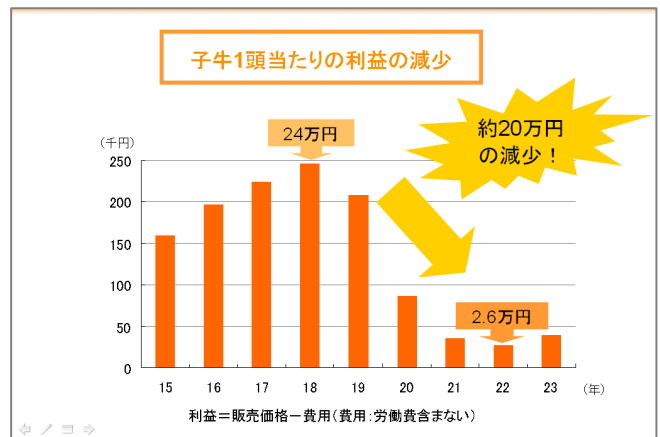


図 3 課題

コントラクターは、飼料生産受託組織であり、共同作業による効率化と低コスト化が可能となる。また、法人化することで、機械導入支援事業に取り組みやすいこと、経営の発展性があること、そして、事業継承しやすいというメリットがある。一方、法人化することにより、法人税が発生し、申告事務作業が必要となってくる。

法人形態としては図4のような種類があることなどを説明し、どの経営体が各担い手農家に適しているかを検討した結果、設立の容易な株式会社とすることとした。

実際に、株式会社A・F・Cを登記するまでには、半年間を要し（図5）、当所も発起人会をはじめとした3戸との話合いの場に参加し、法人化になるまでの説明や事業計画・営農計画・定款の作成支援を行った。

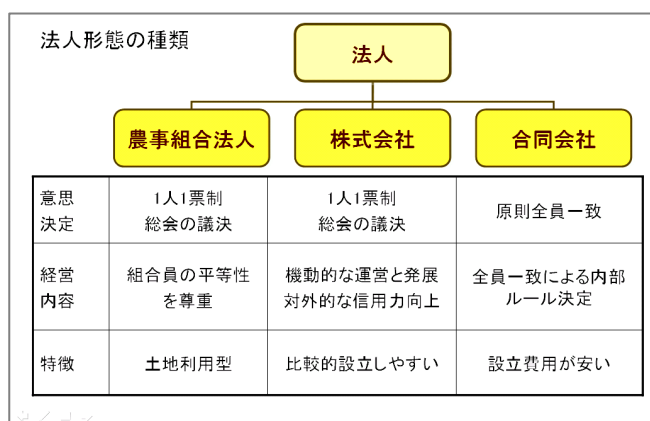


図4 法人形態の種類

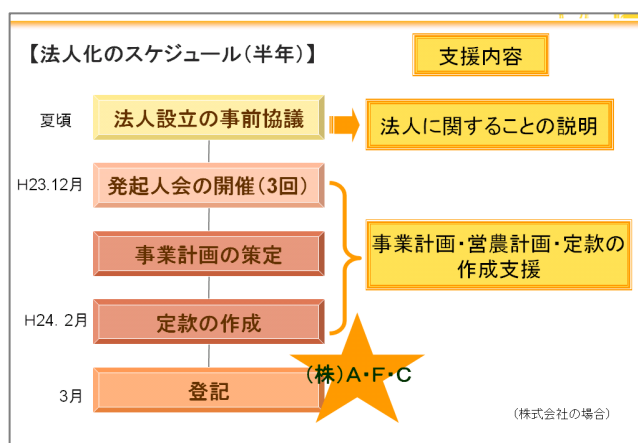


図5 法人化のスケジュール

3 集落法人等との連携

(株)A・F・Cとして法人化されたことにより、作業効率が向上したことから、さらに安定的な稲わら収集を目的として、大規模に土地を集積している集落法人等と連携することを検討した。(株)A・F・C事務所の近くで営農している3集落法人等は、土作りのため堆肥を投入しており、稲わらについては、すき込みや焼却により処理をしている状況であった。平成23年度には、3集落法人等との連携を推進し、70haを収集する契約を締結、平成24年度には全面積を収集することができた。(表1)

表1 収集実績

収集実績			
	H22年度 【個人】	H23年度	H24年度
契約面積	-	60ha	70ha
収集面積	9ha	30ha	70ha
作業日数	30日	33日	50日
作業効率	0.3ha/日	0.9ha/日	1.4ha/日
機械体系	けん引式	けん引式	クローラ式

4 機械整備支援

平成 23 年度秋は、共同作業を始め個々の機械を利用したトラクターけん引式機械体系で作業を行った。作業の流れとしては、稲わらをテッターで集草反転し、ロールベアラーで梱包を行い、ラッピングマシーンで密封し、そして、グリップでロールの圃場外への運搬を行う。

しかし、この作業体系では、牽引式のため、軟弱水田には向かず、小さな回転も困難である。特にこの年は天候不順のため、契約面積をすべて収集できず、課題となった。この課題対応として、駆動部分がキャタピラ式自動型のクローラ式機械を導入することとした。

平成 23 年度末に事業により機械を導入(写真 1)、平成 24 年度から、クローラ式機械体系で作業を行うことで、収集面積を 2 倍以上拡大することとなった。



自走式ロールベアラー

自走式ラッピングマシーン

写真 1 導入機械

まとめ

- 1 法人化（株式会社）することで、各種事業に取り組み易い体制が可能となり、今後外部雇用や後継者の育成など様々な展開を広げていくことが可能となった。
 - 2 集落法人等と連携することで、収集契約や作業進行管理を総合的に実施することができた。また、連続している水田で収集を実施するなど作業の効率化が図られた。
 - 3 法人化により自走式の収穫・梱包機械を導入することが可能となったため、湿田での作業効率が向上し、平成 23 年度実績の 30ha から、平成 24 年度は約 70ha まで収集面積を拡大することができた。収集した稲わら価格は、原物換算で 1 k g 当たり 15 円となり、購入国産稲わら価格 35 円と比較すると 20 円安価と、飼料費の低減につながった。
- 以上のことから、和牛農家の担い手が、コントラクターを組織化することで、効率的かつ安定的に稲わらを収集することができ、地域の和牛経営の安定につながった。

管内における稲発酵粗飼料の取組状況

東部畜産事務所
○松本早織 三木智彦

はじめに

稲発酵粗飼料（以下、稲 WCS）は全国的に生産及び利用が拡大しており、その背景として飼料価格の高騰、子牛や枝肉価格の低迷、戸別所得補償制度による耕種農家の生産拡大、安全・安心な畜産物の需要拡大、耕畜連携の推進等がある。このような中、広島県酪農・肉用牛生産近代化計画は、平成 32 年度までに稲 WCS 作付面積の目標を 450ha としており、平成 24 年度の稲 WCS 作付面積は、県全体では 227ha、管内では 85ha で、平成 20 年度と比較して共に 1.7 倍に拡大している（図 1）。

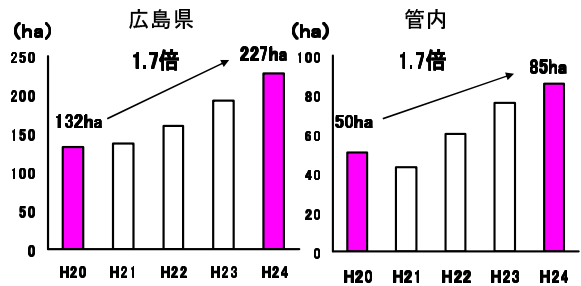


図1 稲WCSの作付面積

また、平成 24 年度の管内市町の生産面積及び生産量は、平成 23 年度と比較して共に拡大している。中でも世羅町、神石高原町の生産量が他の市町と比較して飛躍的に拡大したのは、多収品種である「たちすずか」への変更が一因である（図 2）。

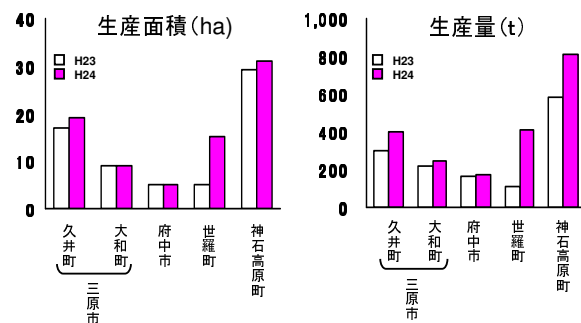


図2 各市町での生産状況

今回、主として肉用牛農家における稲 WCS の需要拡大の基礎データとするため、平成 23 年度産稲 WCS の管内における流通状況及び給与状況等を調査したので、その概要を報告する。

方法

1. 地域別の稲 WCS 生産組織の検討会に参加し、稲 WCS の生産・利用状況等の情報収集を行った。
2. 稲 WCS を利用している管内の肉用牛農家 (F1 肥育を含む) 30 戸、乳用牛農家 19 戸に対し、利用状況や給与量、給与期間、問題点等のアンケート調査を実施した。
3. 稲 WCS の給与方法等に特徴があった 5 戸の肉用牛農家を稲 WCS 給与事例農家として抽出し、巡回調査を行った。

成績

1. 地域検討会における情報の内容

神石高原町、府中市、世羅町、三原市大和町、三原市久井町に稲 WCS 生産組織が存在し、生産計画、配

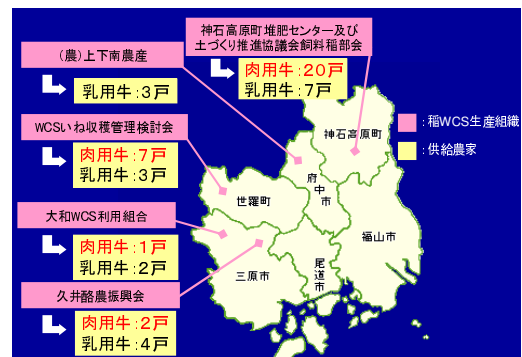


図3 稲 WCS 生産組織と供給農家の位置図

分量、販売価格等を決定し、図3に示すとおり神石高原町20戸、世羅町7戸、三原市大和町1戸、三原市久井町2戸の合計30戸の肉用牛農家へ供給していた。また、乳用牛農家へは合計19戸へ供給していた。

2. アンケート調査結果

アンケートの回答は肉用牛農家24戸及び乳用牛農家12戸からあったが、今回は肉用牛農家についての内容を報告する。

給与量は、原物で1~21kgと農家によって大きく差が見られた。また、4戸で給与量の増加を希望していた。

給与期間は、冬から春が中心で、3戸の農家で通年給与を行っていた。なお、9戸の農家で給与期間の延長を希望しており、そのうち2戸は通年給与を希望していた(図4)。

嗜好性及び品質は、18戸の農家で「大変良いあるいは良い」と回答しており、概ね好評であった(図5)。なお、品質について「まあまああるいは悪い」と回答した農家においては、カビ等の発生により部分廃棄や全廃棄したロールあるいはヒエなどの雑草やビニールが混入しているロールが認められた。

3. 稲WCS給与事例農家の調査結果

1) A 農家

肥育牛135頭、繁殖牛44頭を飼養する和牛一貫経営。

繁殖牛に細断型ロールペーラーで収穫・調整した「クサノホシ」の稲WCSを12~3月にかけて1日約21kg給与していた。また、給与に当たっては、必ず飼料計算を実施していた。なお、健康状態や繁殖成績等への影響は特にみられなかった(図6)。

2) B 農家

繁殖牛80頭を飼養する和牛繁殖経営。12~5月にかけて1日約20kg給与していた。冬場の粗飼料コストの削減効果が大きかったことから、今後は通年給与を希望していた。その際、夏場の品質保持のために乳酸菌の添加の要望があった。給与に当たっては、ビタミンや他の乾草を給与することで、栄養バランスを調整していた。

3) C 農家

繁殖牛125頭を飼養する和牛繁殖経営。1日8.5kgを通年給与しており、夏場に多少のカビの発生はあったが、乳酸菌の添加なしでも問題なく給与できた。また、「たちすずか」は、嗜好性が大変よく、毛艶などの健康状態も向上した。

4) D 農家

肥育牛約900頭を飼養するF1肥育経営。1~5月にかけて1日約1.4kgを肥育中期後半から後期にかけて給与していた。給与量は少ないが、嗜好性が大変良いことから食欲増進を目的として給与しており、食いつきで牛の健康状態をチェックしていた。また、「たちすずか」はモミが少ないため使い易く、βカ

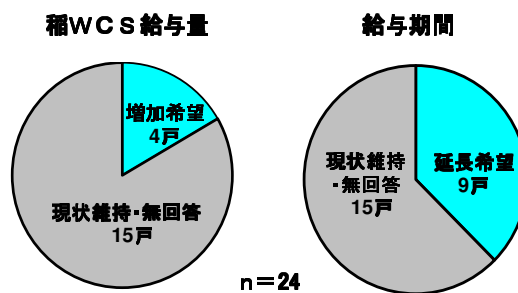


図4 アンケート結果

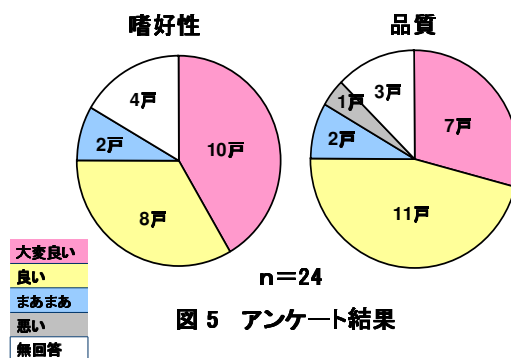


図5 アンケート結果

ロテンの含有量が多少多くても他の飼料で調整して給与していた。今後は、通年給与を希望していた。

5) E 農家

肥育牛 350 頭、繁殖牛 35 頭を飼養する和牛一貫経営。試験研究の一貫で肥育牛 8 頭に、遅刈りの稲 WCS を TMR に調整して給与していた。9～15 ヶ月齢時に 1 日約 5kg、16 ヶ月齢～出荷時まで 1 日約 3kg と、肥育ステージに合わせて給与量を変えていた。給与期間は、通年給与。肥育成績はまだ出ていないが、今までのところ順調に増体しており、嗜好性も大変良いことから今後も継続して給与を希望していた (図 7)。



図6 A農家のロールの保管状況



図7 E農家の給与状況

まとめ及び考察

アンケート調査の結果から、品質、価格及び供給量の安定、保管場所の確保、使用済のラップフィルムの処理、ロール毎に栄養成分の変動があること等の課題や購入乾草等と比較してロールが大きくて重いことにより運搬等の取扱作業が大変となり小規模農家での利用が難しいという意見が依然としてあった。また、肥育牛へ利用する際には、βカロテンのコントロールが課題として挙げられた。

以上のように、解決すべき課題がある中、2戸の農家で飼料計算等を前提として、繁殖牛に 1 日約 20kg 給与していること、4戸の農家で今後給与量の増加を希望していること、9戸の農家で給与期間の延長を希望していること等から、今後更なる稲 WCS の利用拡大の可能性が示唆された。

今後も当所を含む関係機関は、連携を取りながら生産や給与の面での技術支援、多収量で栄養価の高い新品種の試験研究等により、課題解決に向けた取組みを継続していく必要がある。また、稲 WCS の生産と利用の拡大をさらに推進することで、自給粗飼料を安定的に確保し、低コストで付加価値の高い広島牛の生産拡大の実現に向けた具体的な取組みにつなげていく。

参考文献

- 1) 飼料用稲の革命的新品種「たちすずか」の技術移転 神田則昭 平成 23 年度広島県立総合技術研究所 畜産技術センター研究成果発表会 報告要旨
- 2) 飼料をめぐる情勢 農林水産省生産局畜産部畜産振興課 平成 24 年 7 月
- 3) 「中山間耕畜連携」プロジェクト経営研究分野成果マニュアル 農業・食品産業技術総合研究機構
- 4) 「たちすずか」WCS の乳用牛および肉用牛への給与 城田圭子 広島県立総合研究所畜産技術センター研修会資料 平成 24 年 12 月 21 日

ワンショット過剰排卵処置による体内受精胚の効率的生産の検討

県立総合技術研究所畜産技術センター

○横田文彦 日高健雅

はじめに

体内受精胚の採取を目的に行われる過剰排卵処置は、卵胞刺激ホルモンであるFSHを漸減投与する方法が一般的に行われている。しかし、この方法はFSHの複数回投与を必要とし作業者の負担を伴うことから、近年、FSHのワンショット投与による方法も研究されている。最近では生理食塩水を溶媒としたFSHをワンショットする方法が青森県などで報告^{1) 2)}されており、今回、当センターでも試験的に実施したのでその概要を報告する。

従来の漸減法による過剰排卵処置は、FSHを3~4日間朝夕漸減しながら投与する方法で、3日間の場合は、FSHは計6回、プロスタグランジンF_{2α}（以下PG）はFSH投与最終日の朝夕の計2回投与されている（図1）。

しかし、この方法は技術者の作業負担と供卵牛へのストレスの問題があり、以前には水酸化アルミニウムゲルやポリビニルピロリドン溶媒としたワンショット法^{3) 4)}が検討されてきた。これらはそれぞれFSHに対する吸着性や吸収遅延効果があるが、過剰排卵処置の成績が不安定あるいは粘稠性が高いなどの問題があり、いずれも市販製剤として実用化されていない。

今回の試験では、青森県などの報告をもとに生理食塩水を溶媒としたFSHワンショット投与の効果を検査するとともに、半減期の異なる2種類のGn-RH製剤の過剰排卵効果の比較、経産牛と未経産牛のワンショット法の効果の比較についても調査を行った。

材料および方法

材料は畜産技術センターで飼養する黒毛和種15頭（うち未経産牛8頭、経産牛7頭）を用い、平成23年3月から平成24年12月の期間で行った。

1. 生理食塩水を溶媒としたFSHワンショット投与効果の調査

ワンショット過剰排卵処置は初回人工授精日の4日前にFSH20AUを生理食塩水50mlに融解し、供卵牛の頸部皮下にワンショット投与し、同時にPGを25mg筋肉内に投与した（図2）。この方法により、漸減法で6回投与していたFSHを1回投与、さらに2回投与していたPGも1回投与になり、作業が軽減される。なお、同期化のために留置型プロゲステロン製剤を陰内に基本12日間留置



図1 漸減法による過剰排卵処置

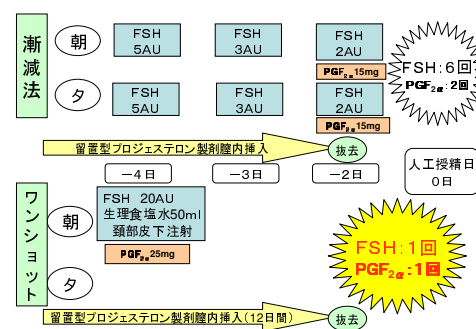


図2 ワンショット過剰排卵処置方法

し、初回人工授精日の2日前に抜去した。

2. 半減期の異なる2種類のGn-RH製剤の過剰排卵効果の比較

今回、半減期の異なる2種類のGn-RH製剤（酢酸フェルチレリン、酢酸ブセレリン）⁵⁾を人工授精前に投与し、推定排卵率を比較してみた。酢酸フェルチレリンは半減期が短く、初回人工授精日の当日朝に1ml、半減期が長く持続性のある酢酸ブセレリンは初回人工授精日の前日夕方に3ml筋肉注射した。

人工授精時の推定卵胞数と採卵時の推定黄体数を超音波画像診断装置でカウントし、推定排卵率も調査した。

3. 経産牛と未経産牛のワンショット法効果の比較

経産牛と未経産牛で人工授精時の推定卵胞数、採卵時の推定黄体数及び平均回収卵数から推定排卵率及び卵の推定回収率を比較した。

・酢酸フェルチレリン製剤

半減期短い



初回人工授精日の
当日朝:1ml注射

・酢酸ブセレリン製剤

半減期長く持続的作用



初回人工授精日の
前日夕方:3ml注射

図3 2種のGn-RH製剤と投与方法

結果

1. 生理食塩水を溶媒としたFSHワンショット投与効果

ワンショット法による経産牛の過剰排卵成績を漸減法の経産牛の成績と比較した。漸減法は、旧広島牛改良センター及び畜産技術センターで平成2年から20年までに実施された1,542頭の成績をもととした。

ワンショット法では、正常胚数は漸減法に比べて若干少なくなっているが、平均推定卵胞数が29.0個、平均推定黄体数が18.9個、平均回収卵数が14.3個と漸減法の21.5個、18.0個、15.3個と同等の成績が得られており、過剰排卵効果が期待できる結果となった。

2. 半減期の異なる2種類のGn-RH製剤の過剰排卵効果の比較

半減期の短い酢酸フェルチレリンが68.0%、持続性のある酢酸ブセレリンが66.5%と、平均推定排卵率については差が認められなかった。

3. 経産牛と未経産牛のワンショット過剰排卵処置成績の比較

経産牛の平均卵胞数29.0個、平均黄体数18.9個に比べ、未経産牛では17.9個、10.4個と数は少なかったものの、過剰排卵効果は認められており、排卵率では差はなかった。未経産牛で卵胞数が少ないのは、発育状況や卵巣の容量が小さいことなどが影響しているものと考えられる。

表1 ワンショット法による過剰排卵成績

過剰排卵方法	平均推定卵胞数	平均推定黄体数	平均回収卵数(正常胚数)
ワンショット法 経産牛(7頭)	29.0±11.7	18.9±10.1	14.3±10.6 (5.9±5.3)
漸減法 経産牛(1,542頭) H2~20	21.5±10.8	18.0±9.7	15.3±10.2 (8.2±7.2)

表2 Gn-RH製剤の排卵率の比較

Gn-RH製剤	平均推定卵胞数	平均推定黄体数	平均推定排卵率(%)
酢酸フェルチレリン(8頭)	15.4±6.1	10.0±5.3	68.0
酢酸ブセレリン(5頭)	32.8±11.6	21.6±10.4	66.5

表3 経産牛・未経産牛の成績の比較

過剰排卵方法	平均推定卵胞数	平均推定黄体数(排卵率%)	平均回収卵数(回収率%)
経産牛(8頭)	29.0±11.7	18.9±10.1 (64.3)	14.3±10.6 (71.8)
未経産牛(7頭)	17.9±11.4	10.4±5.9 (64.5)	3.4±3.5 (30.3)

卵の回収率は、経産牛の 71.8%に対し未経産牛では 30.3%と低くなっている。これは未経産牛では卵管採りが小さく、腹腔内への排卵の可能性や子宮頸管が狭いためにバルーンカテーテルの挿入などの回収作業が困難な場合があることも原因として考えられる。

まとめ

今回の試験で生理食塩水を溶媒とした FSH のワンショット法でも過剰排卵効果は期待できる結果となった。今回は黒毛和種 15 頭で行ったが、今後も例数を重ねワンショット過剰排卵処置反応の安定性を確認する必要がある。

半減期の異なる 2 つの Gn-RH 製剤（酢酸フェルチレリン，酢酸ブセレリン）の人工授精前の投与では、排卵率に差は認めらなかった。しかし、今回使用した 2 種類の Gn-RH 製剤について、採卵個数や正常胚率への影響に関する報告事例⁶⁾もあり、今後も調査が必要である。

また、経産牛および未経産牛では卵胞数、黄体数ともに差はあったものの過剰排卵効果は認められた。ただし、未経産牛では、卵の回収率が低かったことから、未経産牛の適切な採卵月齢や胚の回収方法の工夫など、今後も検討する必要がある。

参考文献

- 1) 平泉真吾, 高橋凡子, 石山 治. 2009. 生理食塩水を溶媒とした FSH 皮下 1 回投与によるウシ過剰排卵処理法の検討. 第 25 回東日本家畜受精卵移植研究大会要旨. 52-53
- 2) 小田 亘, 中原 仁. 黒毛和種における 1 ショット過剰排卵処理法. 平成 24 年度獣医学術中国地区学会要旨. 32
- 3) 磯崎良寛, 稲田 淳, 浅田研一, 古賀鉄也, 木村康二, 角川博哉, 平子 誠. 2007. 黒毛和種雌牛における卵胞刺激ホルモン皮下 1 回投与による過剰排卵誘起法 第 1 報 水酸化アルミニウムゲル吸着卵胞刺激ホルモン投与牛における血漿中卵胞刺激ホルモン濃度の推移および過剰排卵誘起効果. 福岡県農業総合試験場研究報告 26 61-64
- 4) 藤山雅照, 中里 敏, 永井晴治, 佐々木正憲. 1996. 黒毛和種における過剰排卵処理の簡易化. 長崎県畜産試験場研究報告 第 5 号. 6-7
- 5) 尾形康弘, 日高健雅, 松重忠美, 堀内俊孝. 2006. Gn-RH 製剤を用いた経膈採卵法の検討. 広島県獣医学会雑誌 No.21. 20-23
- 6) 荒木勇介. 2008. 過剰排卵処置後に投与した酢酸ブセレリンの効果. 滋賀県立畜産技術振興センター報告

周産期疾病多発牛群に対するルーメンフィルスコアを用いた牛群検診の一事例

NOSAI 広島 家畜臨床研修所

○黒瀬智泰

はじめに

ルーメンフィルスコア（以下 RFS）は左臍部の張り具合をスコア 1 のほとんど飼料を食べていない状態からスコア 5 の十分に摂取している状態まで 5 段階評価するもので、およそ 12 時間以内の乾物摂取量の指標とされる。今回、周産期疾病多発牛群において RFS を用いた牛群検診を行い、成果を検証したので報告する。本牧場では 2011 年 3 月に周産期疾病が増加し、分娩牛の約 7 割で産前の採食低下、産後低カルシウム血症および胎盤停滞をみとめ、また、第四胃変位も併発していた。さらに、2011 年 6～7 月にも分娩した 11 頭中 6 頭が周産期疾病を発症した。そこで、周産期疾病多発の原因究明、疾病発生の低減を目的として牛群検診を行った。しかし、本牧場は牛群検定を実施しておらず、代謝プロファイルテストの実績もないため、まず、飼料計算、BCS および RFS のみを用いて検診を行い、その成果を検証したので報告する。

材料と方法

供試牛群は管内にある経産牛 7 2 頭、搾乳牛 5 6 頭、経産牛一頭当たり年間乳量 9,003kg の牛群で、泌乳期をタイストール A 牛舎、乾乳期～分娩後をタイストール B 牛舎の別棟で飼養されており、ともに分離給与形式であったが、A 牛舎のみ自動給餌機による多回給餌が行われていた。周産期疾病が 2011 年 3 月から増加し始め 2011 年 6～7 月に分娩した 11 頭中 6 頭が発症（第四胃左方変位 3 例、乳熱 2 例、ケトosis 1 例）したため、7 月 20 日に牛群診断を行った。診断材料は RFS、ボディコンディションスコア（以下 BCS）および飼料計算を用いた。その結果をもとに対策を開始し、およそ半年後の 2 月 28 日に再度牛群検診を行った。対策前後の効果検証として RFS、BCS、飼料計算、周産期疾病発症数、出荷乳量および血液検査を調査した。なお、調査期間を 2011 年 5 月から 2012 年 2 月までとし、対策実施開始の 8 月以降に乾乳された牛が分娩する 10 月から 5 ヶ月間を対策後、それ以前の 5 ヶ月間を対策前とした。

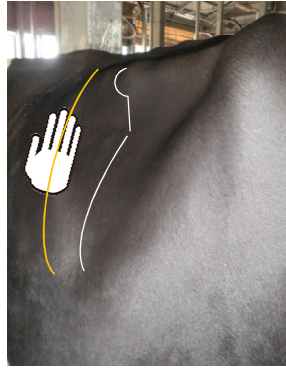
RFS¹⁻³⁾の観察部位は①腰椎横突起下の皮膚の折れ込み，②臍部ルーメンの張り具合，③最後肋骨から臍部のへこみ，④腰角からの皮膚の向きの4箇所とした。評価方法は，表1および図1に示した通りで，腰椎横突起下の皮膚の折れ込みについてスコア4は折れ込みなく，外へ張り出している状態で，スコア3は手の厚み分折れ込み垂直に下垂し，スコア2では内側に曲線を描くように折れ込む。さらにスコア3と2では最後肋骨から臍部への凹みが，スコア3は手の幅一つ分未満なのに対し，スコア2は手の幅一つ分凹んでいる状態となる。基準となるスコアは乾乳期で4以上，泌乳期で3以上とされている。観察時の注意点はルーメンが最も弛緩している時点をスコアリングすることと，モニターする時間帯は空腹時が最もよく，採食直後はさけることである。

表1 ルーメンフィルスコア

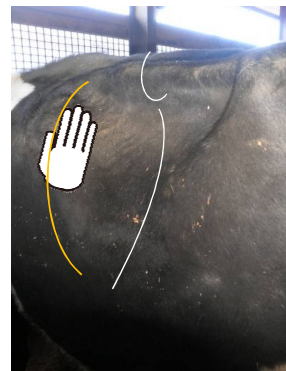
RFS	腰椎横突起下 皮膚の折れ込み	? 部のへこみ	? 部最後肋骨部のへ こみ	腰角から折り込まれ た皮膚の向き
5	なし/ 横突起見えない	なし	なし	—
4	なし/外側に曲線	はっきり見えない	はっきり見えない	—
3	手の厚み分/ 垂直に下垂	わずかに見える	手の幅一つ分 未満	—
2	内側に曲線	三角形	手の幅一つ分	最後肋骨に向う
1	内側に曲線	台形	手の幅一つ分 以上	垂直に下がる



スコア4



スコア3



スコア2

図1 ルーメンフィルスコアの評価方法

成績

1) 初回牛群検診結果 (対策前)

初回 2011 年 7 月の牛群検診の結果を表 2, 図 2, 図 3 に示した。飼料計算 (表 2) では, 泌乳期は CP, TDN とともにやや低いものの, DM は充足していた。しかし, 乾乳期の DM は前期 7.0 kg, 後期 10.9kg と明らかな給与不足が見られた。BCS (図 2) は全体的に標準範囲以下の牛が多く, 痩せており, 乾乳期には削瘦が進行している傾向がみられ, 乾乳期 3.11 ± 0.38 から泌乳最盛期 2.70 ± 0.34 まで漸次低下しており, 産後の回復も遅いようであった。RFS (図 3) は, 約 4 割の牛が基準スコアを下回っており, とくに乾乳牛は平均 2.2 ± 0.4 と全頭, 基準となるスコア 4 に達していなかった。また, 泌乳初期～最盛期にも低い牛が多くみられた。

表2 対策前の飼料計算 (2011年7月)

給与飼料	乳量40kg	給与飼料	乾乳前期	乾乳後期
チモシー乾草	5kg	スーダン乾草	5kg	5kg
オーツヘイ	7kg	オーツヘイ		2kg
配合 (CP17)	14kg	配合 (CP17)	2.5kg	5kg
サプリメント (CP24)	2.4kg			
ビートバルブ	1kg	ビートバルブ	0.5kg	0.5kg
圧搾大豆	0.3kg			
CP%	15.5	CP%	12.7	13.3
TDN%	71.1	TDN%	65.1	66.6
CFi%	20.6	CFi%	25.2	23.7
DM (kg)	25.84	DM (kg)	7.02	10.92
DM(充足率)	109	DM(充足率)	50.9	74.9
NDF% (DM)	39.5	NDF% (DM)	47.3	43
ADF% (DM)	21.3	ADF% (DM)	28.9	26
NFC% (DM)	33.9	NFC% (DM)	26.4	29.3

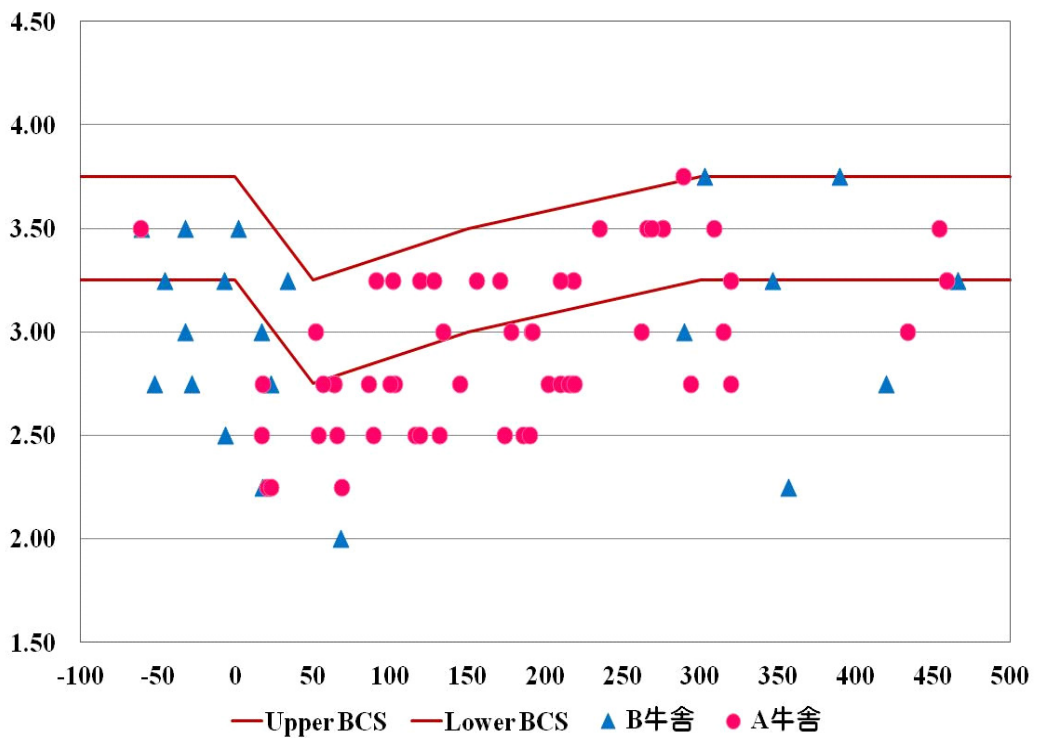


図2 対策前のBCS (2011年7月)

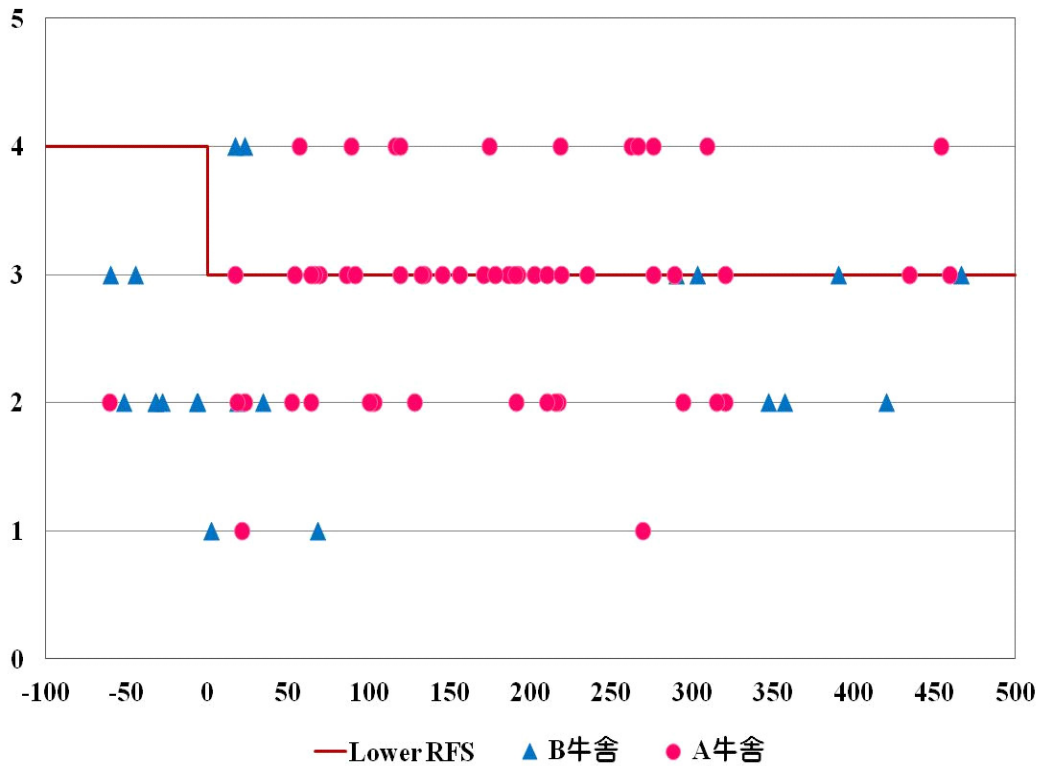


図3 対策前のRFS (2011年7月)

2) 診断と対策

診断結果から乾乳期にDM不足のために痩せ始め、産後も食い込むことができず、急激に痩せてしまい、負のエネルギーバランスからの回復が遅くなっていることが分かった。そこで、乾乳期のDM不足の改善として良質粗飼料の増量および分娩後早期に多回給餌のできるA牛舎への移動の2点ですぐに理解が得られ、対策として実施した。

給与量など具体的な内容は畜主自らが考え、表3のように乾乳期にスーダン乾草と配合が増量され、さらに後期にはチモシー乾草が追加給与された。乾乳期DMは対策前に比べてかなり増え、前期8.3kg後期14.4kgとなり、乾乳後期は充足率98%まで改善した。

表3 飼料給与の改善策および飼料計算（2011年8月）

給与飼料	乾乳前期	乾乳後期
スーダン乾草	6kg	6kg
オーツヘイ		2kg
チモシー乾草		2kg
配合(CP17)	3kg	6kg
ビートパルプ	0.5kg	0.5kg
CP%	12.7	12.8
TDN%	65	65.6
CFi%	25.3	25
DM(kg)	8.34	14.38
DM(充足率)	60.5	98.6
NDF%(DM)	47.2	45.2
ADF%(DM)	28.9	27.5
NFC%(DM)	26.4	27.7

3) 対策前後の比較

周産期疾病発生数（表4）は対策前の発生率44.4%から17.2%に減少した。とくに第四胃変位の減少が顕著だった。BCSおよびRFSは各乳期ステージ別の平均値の推移を図4および図5に示した。BCS（図4）は対策後も対策前と同様に産後の急激な削瘦が認められたが、泌乳最盛期で回復傾向が見られ、対策前よりも対策後で産後の回復が早くなっている傾向にあった。RFS（図5）は対策後、乾乳前期、後期ともに、まだ基準以下であるものの、乾乳後期で 3.0 ± 0.0 と有意にスコアが上昇し、泌乳最盛期からは平均スコアが3.25と基準以上に上昇、全ステージで対策前よりも高い傾向が認められた。血液検査所見（表5）では対策後は乾乳期で血糖値が高く、泌乳初期の遊離脂肪酸の上昇も軽減していた。また、アルブミンは対策後で泌乳初期の低下が認められず、マグネシウムも乾乳期、泌乳初期ともに対策後のほうが高い傾向にあった。なお、搾乳牛一頭当たりの日乳量は対策前31.7kgから対策後31kgと減少したが、前年同時期と比較すると、減少幅は少なくなっていた。

表 4 対策前後における周産期疾病発生数の比較

	分娩頭数	周産期疾病発生数	
		発生頭数	発生率 (%)
対策前	27	12 ※1	44.4
対策後	29	5 ※2	17.2

内訳

※ 1 : 第四胃左方変位 4 例、ケトーシス 3 例、乳熱 2 例、胎盤・悪露停滞 2 例、脂肪肝 1 例

※ 2 : 第四胃左方変位 1 例、ケトーシス 2 例、産褥熱 2 例

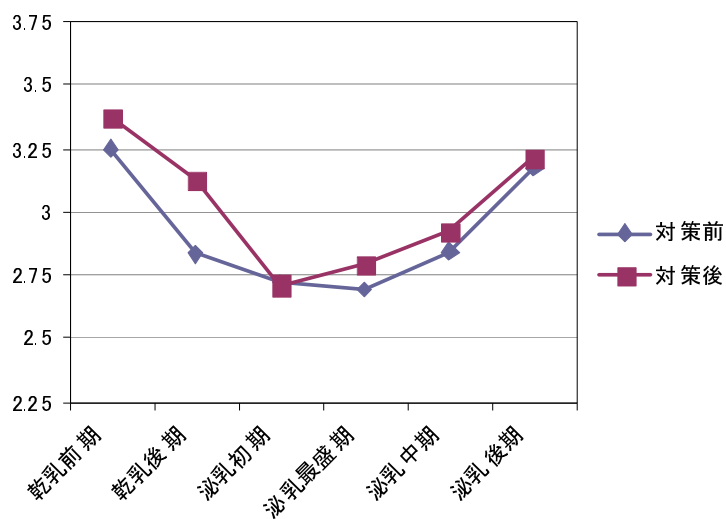


図 4 対策前後における泌乳ステージによる BCS の推移

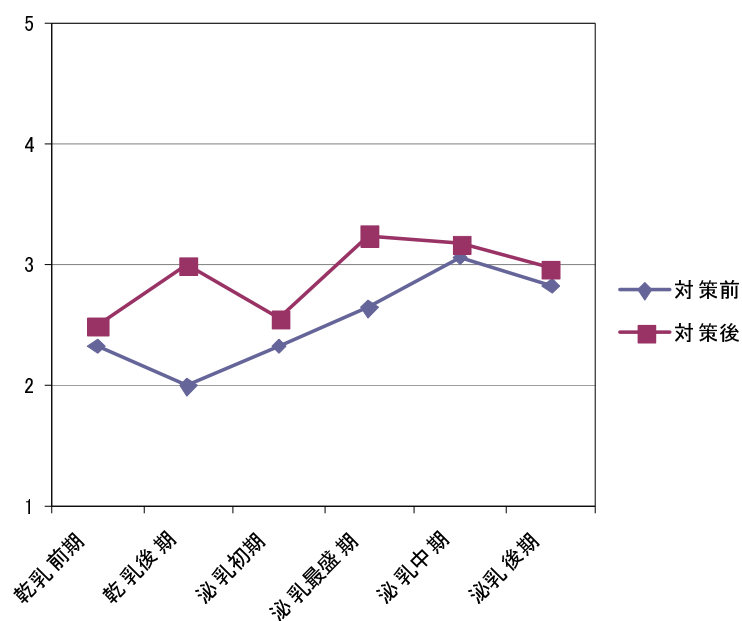


図5 対策前後における泌乳ステージによるRFSの推移

表5 対策前後におけるステージ別血液性状の比較

項目		乾乳後期		泌乳初期	
		値	標準偏差	値	標準偏差
血糖値	(mg/dl)	対策前	58.5 ± 0.7	52.5 ± 4.9	
		対策後	62.3 ± 2.1	51.7 ± 2.1	
NEFA	(mEq/L)	対策前	228.1 ± 47.0	637.5 ± 490.3	
		対策後	137.9 ± 70.0	347.2 ± 108.2	
アルブミン	(g/dl)	対策前	3.59 ± 0.09	3.28 ± 0.76	
		対策後	3.65 ± 0.11	3.76 ± 0.34	
マグネシウム	(mg/dl)	対策前	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.2	
		対策後	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	

対策前後ともに乾乳後期 n = 2、泌乳初期 n = 3

考察

本事例は牛群検定等のデータがない状況下であったが、RFS、BCS および飼料計算を利用して牛群検診を行うことで、検診目的であった周産期疾病の低減を達成するだけでなく、産後の負のエネルギーバランスを早くに回避できるという十分な成果が得られた。

また、RFS は農家にも理解しやすく、視覚的に問題点の原因を強く印象付けることができ、改善のための動機付けにも役立つ非常に有用な手法であると思われた。道具も必要ないため、農家からの牛群検診の依頼にも、牛群検定成績や血液プロファイルテストを待つことなく、迅速に対応できる。本事例もスムーズに対策を立てることができた。また、得られた情報は現場ですぐに使い、対策前後の成果検証においても判断が容易となる。実際に牛の前で、その状態を畜主とともに確認しながら、他の牛群情報と組み合わせることで、信頼性が高く、納得してもらえる牛群検診ができると考えられた。今後の牛群検診にも RFS を有効に活用していきたいと考える。

参考文献

- 1) Dirk Zaaijer, Jos P.T.M. Noordhuizen:A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows, Irish Veterinary Journal, 56, 141-151 (2003)
- 2) Jan Hulsen:COW SIGNALS 乳牛の健康管理のための実践ガイド 日本語版, 中田健訳, 58-73, デーリィマン社, 北海道 (2008)
- 3) 中田健: 酪農ジャーナル臨時増刊号 乳牛群の健康管理のための環境モニタリング, 及川伸監修, 12-13, 酪農学園大学エクステンションセンター, 北海道 (2011)

高体細胞数牛群への乳質改善アプローチ例

NOSAI 広島 山県家畜診療所

○篠塚康典

序 文

乳房炎による酪農家の被害は甚大で、その発生件数は成乳牛の病傷事故のトップであり、増加傾向にある（図1）。また、治療に用いられる乳房炎軟膏の年間購入金額（NOSAI 広島）は全医薬品購入額のおよそ 7%を占めており、保険診療へ与える影響も大きい。これらのことから乳房炎防除に対して、これまで以上の取り組みが求められている。今回、酪農家およびNOSAI 広島の損害防止を目的として、三次家畜診療所管内のバルク乳体細胞数の高い牛群に対して乳質改善の取り組みを行ったのでその概要を報告する。

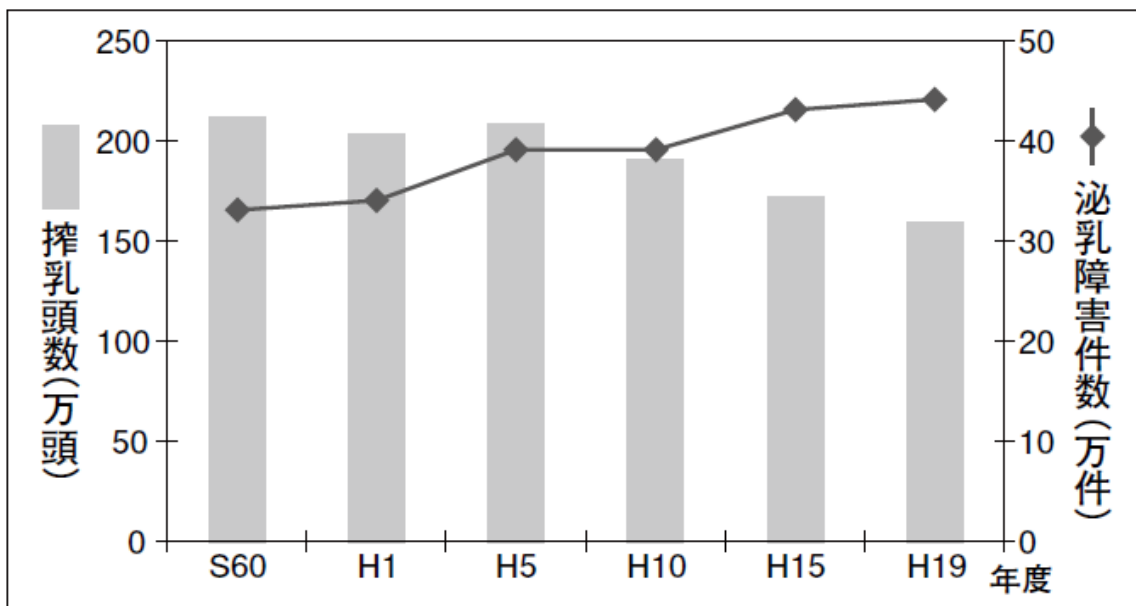


図1 搾乳頭数と泌乳障害件数の推移 平成19年度家畜共済統計

材料と方法

搾乳牛 120 頭（平均乳量 9500Kg） フリーストール、バルク乳体細胞数 30 万/ml 前後の牛群において、夏場にかけて臨床型乳房炎が増えたため原因の分析と対策を講じ、その後の推移を調査した。乳房炎原因菌を特定するためバルク乳細菌培養検査および臨床型乳房炎の細菌培養検査を行った。環境要因の調査として堆肥および敷料の培養検査、ミルクシステムチェックを実施した。また、人的要因を評価するため搾乳立会を実施した。バルク乳細菌検査は対策実施前と実施後の 2 回、菌種および菌量を測定した。検査は M' s Dairy Lab（埼玉県）に依頼した。臨床型乳房炎は発症ごとに当家畜診療所で培養・同定した。堆肥および敷料の培養検査は家畜保健衛生所に依頼した。ミルクシステムチェックは広島県酪農業協同組合に依頼した。搾乳立会は、対策実施前と実施後の 2 回行い、ゼノアックの協力のもとラクトコーダーを用いて搾乳方法を客観的に評価した。これらの結果を踏まえ農場でワークショップを 2 回実施し、搾乳方法の見直しなどの対策を講じた。対策後のバルク乳体細胞数、乳房炎軟膏使用金額を調査し、バルク乳細菌検査を実施した。リニアスコアは牛群検定成績を利用した。

成績

対策実施前のバルク乳からは環境性菌が多く分離された（表1）。

表1 バルク乳細菌検査結果（1回目）

項目		結果（個/ml）	目標	やや多い	多い	非常に多い
伝染性細菌	SA	0	0	～100	～200	>200
	SAG	0	0	～100	～300	>300
環境性細菌	CNS	180	～100	～200	～400	>400
	OS	1200	～400	～800	～2000	>2000
大腸菌群	CO	10000	～10	～100	～300	>300
その他環境性細菌		27020				
生菌数		38400	～2000	～4000	～8000	～30000

臨床型乳房炎の原因菌は環境性連鎖球菌、大腸菌群が多く約半数は菌分離陰性であった。黄色ブドウ球菌などの伝染性菌やマイコプラズマ、プロトセカ、真菌などは分離されなかった（図2）。

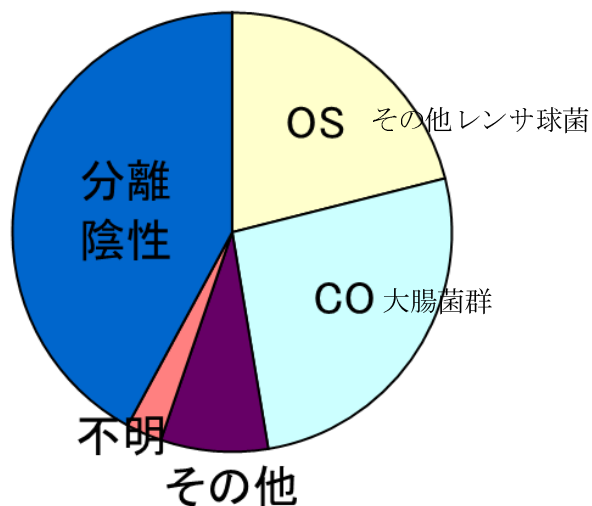


図2 臨床型乳房炎原因菌検索結果（26頭37分房）

堆肥・敷料から有意な菌は分離されなかった。ミルクシステムに問題はなかった。搾乳立会では特に問題は

みられなかったが、ラクトコーダーを用いた検査結果は、オキシトシンによる泌乳開始前にミルカーを装着した際に起きる「二度だし」傾向が多かった。ミルカー離脱のタイミングは問題なかった（図3）。

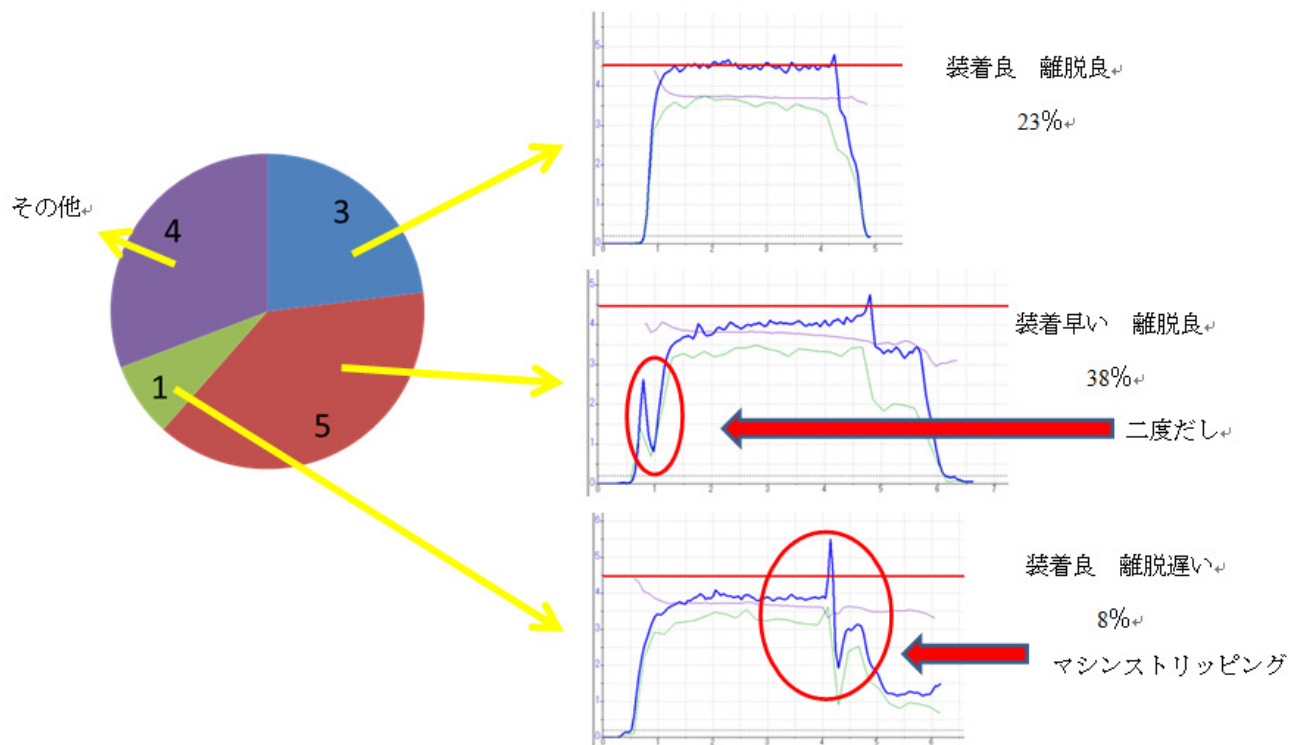


図3 ラクトコーダー検査結果（13頭）

農場でのワークショップで搾乳前の乳頭先端拭き取り徹底とミルカー装着を少し遅らせ、オキシトシン分泌に沿ったタイミングを提案、実行することとした。対策実施後のバルク乳中環境性菌は減少したがやや高いレベルであった（表2）。

表2 バルク乳細菌検査結果（2回目）

項目		結果（個/ml）	目標	やや多い	多い	非常に多い
伝染性細菌	SA	0	0	～100	～200	>200
	SAG	0	0	～100	～300	>300
環境性細菌	CNS	20	～100	～200	～400	>400

	OS	480	~400	~800	~2000	>2000
大腸菌群	CO	80	~10	~100	~300	>300
その他環境性細菌		2120				
生菌数		2700	~2000	~4000	~8000	~30000

バルク乳体細胞数・乳房炎軟膏使用量も漸減したが（図4）、群評価の指標として用いられるリニアスコアは変化がなかった（図5）。

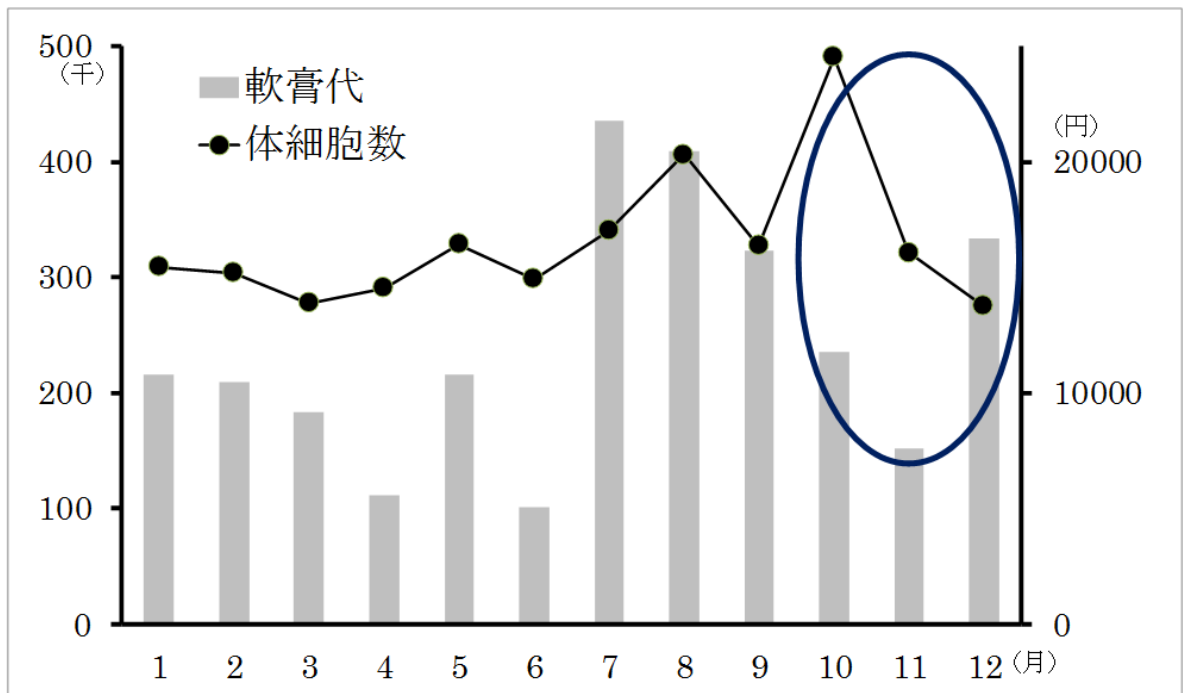


図4 バルク乳体細胞数と薬品代の推移

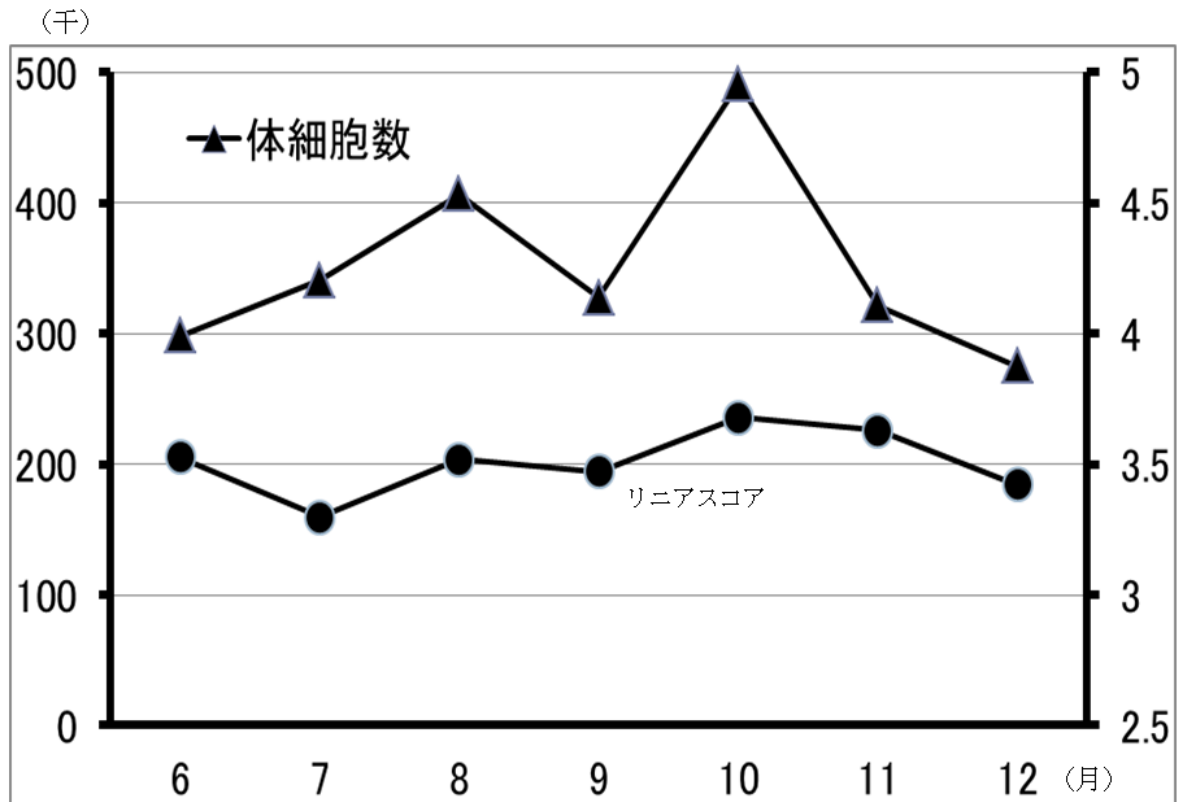


図5 バルク乳体細胞数とリニアスコアの推移（リニアスコアは牛群検定成績の平均値）

考察

当農場のバルク乳および臨床型乳房炎乳汁から黄色ブドウ球菌や無乳性連鎖球菌といった伝染性菌は分離されず、大腸菌や環境性連鎖球菌が多く分離されたことから、バルク乳の体細胞数上昇の原因は環境性菌であると考えられた。ミルクシステムは正常で牛床環境中の菌量に問題はなかったことから、何らかの原因で乳頭口から菌が侵入しやすくなっていることが示唆された。ラクトコーダーを用いた検査結果ではミルクの離脱遅延による過搾乳はみられなかったが、搾乳直後に流量が大きく変動するいわゆる「二度だし」現象がみられなど、ミルクの早期装着傾向が指摘され、搾乳立会においても乳頭先端の角化がすすみリング状にみえてくる個体も多数確認されたことから、オキシトシンが十分に分泌される前に搾乳することによって乳頭口に負担がかかっていることが考えられた。また、ミルク装着前の乳頭ふき取りについて、乳頭側面は十分に行われていたが、乳頭先端部分は不十分であり糞尿の拭きのこしも見られた。乳頭口スコアの高い場合はさらにふき取りが困難となっているようであったことから、本農場の感染原因はミルク早期装着によって乳頭口スコアが上昇したことともない乳頭先端の拭き取りが不十分となったためと推察した。

結果に基づいて農場でワークショップを実施した。目的は実際に行動に移してもらうために、乳頭先端をきれいにすることが臨床型乳房炎やバルク乳体細胞数を減らすことにつながる、という意識をスタッフ全員が共有することとした。ワークショップでは、搾乳前の乳頭や乳頭口の拭き取り方について広島県酪農業協同組合の方に具体的な実地指導をしていただいた。また、拭き取りやすい乳頭口を維持するためにミルクの装着を今より

遅くする必要があるので、時間を稼ぐためにも前搾りの回数を増やすこと、乳頭先端の丁寧な拭き取りを行ってもらうことを提案した。ワークショップ後速やかに改善が図られ、対策実施後バルク乳体細胞数は漸減し、30 万/ml 以下という目標は達成され、乳房炎軟膏の使用量も減少した。一方、群の乳房炎感染レベルの指標とされるリニアスコア¹⁾は変化がなかった。その後発症した臨床型乳房炎も環境性菌による再発がほとんどを占めており、牛群に潜在性乳房炎が大きく関与していることが示唆された。潜在性乳房炎の完治は困難であることが多いため、新規感染予防により時間をかけて群全体のレベルを下げていくことが現実的な対応になると思われる。すなわち、乳房炎新規感染時には細菌培養検査を実施し、原因菌別ガイドラインに沿った適切な治療を行い医原的に潜在化させないことが重要となるであろう。

今回の取り組みでは家畜保健衛生所や広島県酪農業協同組合、ゼノアックなど多くの機関の協力を得た。継続・安定した酪農家支援を行うためには関係機関から構成される支援チームの必要性を強く感じた。

文献

- 1) 斉藤祐介, 体細胞数とリニアスコアの比較, Dairy Jpn, 45, 61-63 (2000)

管内一酪農家において発生した多剤耐性サルモネラニューポート (MDR *Salmonella* Newport) 感染症

1) NOSAI 広島 三次家畜診療所

2) NOSAI 広島 山県家畜診療所

○ 松山 尚子¹⁾ 平田晴美¹⁾ 神岡康博¹⁾ 篠塚康典²⁾

はじめに

牛のサルモネラ感染症は発熱、腸炎、敗血症、流産、肺炎、脳炎、乳房炎などを引き起こし、農家に多大な損害を与える疾病である¹⁾。人の食中毒菌でもあることから、発生すると牧場を清浄化させるために多くの労力と経費が必要となる。近年では、届出伝染病であるサルモネラ・ティフィムリウム、ダブリン、エンテリティディス以外の血清型によるサルモネラ感染症の発生が増加しており、海外において家畜・人の多剤耐性サルモネラニューポート感染症が問題視されている²⁾。平成 23 年 6 月に管内一酪農家において、多剤耐性サルモネラニューポート感染症が発生したので概要を報告する。

経過



写真1 水様血便

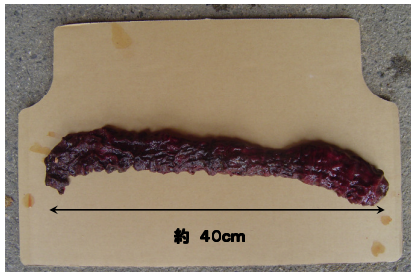


写真2 排泄された偽膜

6/6 2頭の牛が40度以上の発熱・下痢・呼吸器症状を発症する。呼吸器症状を呈し体力の消耗が激しかったため、初診時はRS感染症を疑っていた。翌6/7には牛群の4割の牛が同症状を呈し、1頭が起立不能となる。出荷乳量は前日の80%に低下した。特異な感染症と判断、家畜保健所に病性鑑定を依頼する。畜主と協議の上で、この時点より搾乳牛舎内の成牛全頭44頭に抗生剤(セファゾリンNa 3g)を投与開始する。6/8 全44頭中12頭が40度以上の熱発を呈する。水様血便を呈する牛が増加(写真1)。重症牛は偽膜を排泄(写真2)。6/9 牛群の5割が感染。6/10 発症牛の糞便からサルモネラニューポートが検出された(表1)。同日夜に感受性結果も判明、多剤耐性サルモネラ菌であった(表2)。6/11 ニューキノロン製剤(エンロフロキサシン4gあるいはメシル酸ダノフラキサシン500mg)の全頭投与を

開始。その後速やかに症状は改善し、新規発症牛も出なかった。6/14 下痢・発熱を呈する牛はなく、終息する。11月に清浄性検査を実施。1頭の糞便からサルモネラが検出され、この牛は直ちに自衛淘汰された。同時に水、敷料、飼い犬の糞を検査し全て陰性であった。被

表1 細菌学的検査結果

検体 No	菌量 (cfu/ml)	ラピッドID32E	O抗原		H抗原		血清型
			i相	2相	1相	2相	
1	増菌培養	<i>Salmonella</i> sp.	O8	e,h	1		
2	7.6×10 ⁸	<i>Salmonella</i> sp.	O8,8	e,h	1,2		SNewport
3	増菌培養	<i>Salmonella</i> sp.	O8	e,h	1		
4	増菌培養	<i>Salmonella</i> sp.	O8	e,h	1		
5	増菌培養	<i>Salmonella</i> sp.	O8	e,h	1		
6	9.0×10	<i>Salmonella</i> sp.	O多価	NT	NT		
7	5.0×10 ⁸	<i>Salmonella</i> sp.	O8,8	e,h	1,2		SNewport
8	6.3×10 ⁸	<i>Salmonella</i> sp.	O8,8	e,h	1,2		SNewport
9	4.3×10 ⁸	<i>Salmonella</i> sp.	O8,8	e,h	1,2		SNewport

表2 薬剤感受性試験結果

系	成分名	判定	系	成分名	判定
ペニシリン系	アモキシシリン	R	マクロライド系	エリスロマイシン	R
	ペニシリン	R	テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	R
	アンピシリン	R	その他	コリスチン	S
セフェム系	ジクロキシシリン	R		ホスホマイシン	S
	セファゾリン	R	ST合剤	スルファイトキサリールナトリウム	R
	セファピリン	R			
	セフォキシム	R	キノロン系	ナリジクス酸	S
アミノグリコシド系	カナマイシン	I	ニューキノロン系	エンロフロキサシン	S
	ストレプトマイシン	R			
	ゲンタマイシン	S	クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	R
	ネオマイシン	R			

害額は計算できたものだけで¥2,367,350であった(表3)。

考察

今回検出されたサルモネラ菌は多剤耐性菌であった。感受性のあるニューキノロン製剤の投与によって、症状は速やかに改善した。感受性のある薬剤をいかに早く投与するかが酪農家の損害に大きく影響するものと思われた。管内の他農家には伝染しなかった。特異な感染症であると判断し、家畜診療所として必要な診療体制を構築できたことが功を奏したと思われた。感染拡大の予防対策として発生農家の診療獣医師を特定し、防護服の着用・専用長靴の設置を行った。休日は通常1名のところを2名に増員し、1名が当農家を診療、もう1名が他農家を診療する体制をとった。本菌感染症による死亡は1頭だけであったが、泌乳量の低下は著しく、生乳廃棄したことによる損失、治療費の増大など損失は甚大であった。発生から終息まで9日間と短期間だったため、泌乳量は2週間後には回復した。感染源を特定できなかったが、状況から推測するに、経口的に原因菌が侵入したと考えられた。サルモネラ菌は飼料中で容易に増殖することが知られており³⁾、酪農家において給与前の飼料を野生動物に汚染されないよう配慮する必要があると思われた。また、当該農家では従来、生菌剤の投与が行われておらず、発症を機会に生菌剤の投与を勧め現在まで投与は継続している。アシドーシスやビタミンA・E濃度の低下が感染や保菌を助長するという報告もある⁴⁾。薬剤による治療や感染予防体制を布くことだけでなく、アシドーシスの予防、ビタミン投与、生菌剤の投与等も積極的に発生初期から行っていくことが終息を早めると考える。発生当初は診療で手一杯となりがちだが、感染源の特定のために努力すべきと思われた。疑わしいサンプル(飼料・胃内容物など)を凍結保管し、後日検査する方法も有効と思われた。また、サルモネラニューポート感染症は人畜共通伝染病であることから、糞尿処理、廃棄乳処理の方法など環境に対する配慮も必要と思われる。

参考文献

- 1) 坪倉 操「牛のサルモネラ症」獣医伝染病学, 清水悠紀臣他編, 第5版, 122-123, 近代出版, 東京(1999)
- 2) CDC アメリカ疾病管理予防センター MMWR 疫学週報 51 (25) : 545-548, 2002
- 3) 東郷真子ら「根室管内における牛のサルモネラ症対策と発生」臨床獣医 Vo,11No.13(1993)
- 4) 中岡祐司「衛生管理でサルモネラ症から牛群を守る」臨床獣医 Vo,30No.2(2012)

表3 被害額算出

・死亡1頭	
・流産4頭 (5ヶ月令・6ヶ月令・6ヶ月令・45日令)	
・10日間の生乳損失	
¥103×1,200 ^円 ×10日=	¥ 1,236,000
・廃棄乳の処理料	¥ 97,200
・診療費 病傷 延べ診療回数349回	¥ 974,450
生菌剤・消毒剤	¥ 59,700
・精神的苦痛・労働時間延長	
	¥ 2,367,350